



**PCT**

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> C12N 15/61, 15/56, 9/90, 9/24, 9/26, 1/21, C12P 19/24 // (C12N 1/21, C12R 1:01, 1:19, 1:18)		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 95/20047 <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 27. Juli 1995 (27.07.95)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP95/00165 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. Januar 1995 (18.01.95) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 44 01 451.1 19. Januar 1994 (19.01.94) DE P 44 14 185.8 22. April 1994 (22.04.94) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT MANNHEIM/OCHSENFURT [DE/DE]; Maximilianstrasse 10, D-68165 Mannheim (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> MATTES, Ralf [DE/DE]; Friedrich-Zundel-Strasse 14, D-70619 Stuttgart (DE). KLEIN, Kathrin [DE/DE]; Ludwigstrasse 82, D-70197 Stuttgart (DE). SCHWECK, Hubert [DE/DE]; John- F.-Kennedy-Strasse 5, D-67549 Worms (DE). MUNIR, Mohammed [DE/DE]; Am Kinderbach 1, D-67271 Kinden- heim (DE). KUNZ, Markwart [DE/DE]; Kernerstrasse 8, D-67550 Worms (DE). <b>(74) Anwälte:</b> GLEISS, Alf-Olav usw.; Maybachstrasse 6A, D- 70469 Stuttgart (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BR, CA, FI, JP, NO, US, eu- ropäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> PRODUCTION OF ACARIOGENIC SUGAR SUBSTITUTES			
<b>(54) Bezeichnung:</b> HERSTELLUNG VON AKARIOGENEN ZUCKERERSATZSTOFFEN			
<b>(57) Abstract</b> <p>Saccharose isomerases are disclosed, as well as DNA sequences that code therefor and a new process for producing non-cariogenic sugars.</p>			
<b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft Saccharose-Isomerasen, dafür codierende DNA-Sequenzen und neue Verfahren zur Herstellung von nicht-kariogenen Zuckern.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Letland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

## Herstellung von akariogenen Zuckerersatzstoffen

## BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von nicht-kariogenen Zuckern, insbesondere Trehalulose oder/und Palatinose, unter Verwendung rekombinanter DNA-Technologie.

Die akariogenen Zuckerersatzstoffe Palatinose (Isomaltulose) und Trehalulose werden großtechnisch aus Saccharose durch eine enzymatische Umlagerung unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen (z.B. der Spezies *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici*, *Serratia plymuthica*) hergestellt. Dabei wird die zwischen den beiden Monosaccharideinheiten des Disaccharids Saccharose bestehende  $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$  glykosidische Bindung zu einer  $\alpha 1 \rightarrow 6$  Bindung bei Palatinose bzw. einer  $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$  Bindung bei Trehalulose isomerisiert. Diese Umlagerung von Saccharose zu den beiden akariogenen Disacchariden erfolgt unter Katalyse des bakteriellen Enzyms Saccharose-Isomerase, auch Saccharose-Mutase genannt. Je nach verwendetem Organismus ergibt sich bei dieser Reaktion ein Produktgemisch, das neben den erwünschten akariogenen Disacchariden Palatinose und Trehalulose auch gewisse Anteile an unerwünschten Monosacchariden (Glucose oder/und Fructose) enthält. Diese Monosaccharidanteile sind ein erhebliches technisches Problem, da zu ihrer Abtrennung aufwendige Reinigungsprozeduren (meist fraktionierte Kristallisationen) erforderlich sind.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, die Bildung von Monosacchariden bei der Isomerisierung von Saccharose zu Trehalulose oder/und Palatinose möglichst weitgehend zu unterdrücken. Eine andere, der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand in der Bereitstellung von Organismen, die Palatinose oder/und Trehalulose in höherer Ausbeute als bekannte Organismen erzeugen.

- 2 -

Zur Lösung dieser Aufgaben werden rekombinante DNA-Moleküle, mit rekombinanten DNA-Molekülen transformierte Organismen, rekombinante Proteine sowie ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von nicht-kariogenen Zuckern, insbesondere von Palatinose oder/und Trehalulose, bereitgestellt.

Ein Gegenstand der Erfindung ist eine DNA-Sequenz, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codiert und

- (a) eine der in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 oder SEQ ID NO. 13 gezeigten Nukleotidsequenzen gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-codierenden Bereich,
- (b) eine der Sequenzen aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz, oder
- (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung soll der Begriff "Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität" solche Proteine umfassen, die zur Isomerisierung von Saccharose zu anderen Disacchariden in der Lage sind, wobei die  $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$  glykosidische Bindung zwischen Glucose und Fructose in der Saccharose in eine andere glykosidische Bindung zwischen zwei Monosaccharideinheiten überführt wird, insbesondere in eine  $\alpha 1 \rightarrow 6$  Bindung oder/und eine  $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$  Bindung. Besonders bevorzugt betrifft der Begriff "Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität" daher ein Protein, das zur Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose oder/und Trehalulose in der Lage ist. Dabei beträgt der Anteil von Palatinose und Trehalulose an den gesamten Disacchariden, die durch Isomerisierung von Saccharose gebildet werden, vorzugsweise  $\geq 2\%$ , besonders bevorzugt  $\geq 20\%$  und am meisten bevorzugt  $\geq 50\%$ .

Die in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz codiert für die vollständige Saccharose-Isomerase aus dem Mikroorganismus *Proteinobacter rubrum* (CBS 547,77) einschließlich des Signalpep-

- 3 -

tidbereichs. Die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Nukleotidsequenz codiert für den N-terminalen Abschnitt der Saccharose-Isomerase aus dem Mikroorganismus *Erwinia rhapontici* (NCPFB 1578) einschließlich des Signalpeptidbereichs. Die in SEQ ID NO. 3 gezeigte Nukleotidsequenz codiert für einen Abschnitt der Saccharose-Isomerase aus dem Mikroorganismus SZ 62 (*Enterobacter spec.*).

Der für das Signalpeptid codierende Bereich der SEQ ID NO. 1 reicht von Nukleotid 1 - 99. In SEQ ID NO. 2 reicht der Signalpeptid-codierende Bereich von Nukleotid 1 - 108. Die DNA-Sequenz gemäß vorliegender Erfindung umfaßt auch die in SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 gezeigten Nukleotidsequenzen ohne den Signalpeptid-codierenden Bereich, da das Signalpeptid in der Regel nur für die korrekte Lokalisierung des reifen Proteins in einem bestimmten Zellkompartement (z.B. im periplasmatischen Raum zwischen der äußeren und der inneren Membran, in der äußeren Membran oder in der inneren Membran) oder für den extrazellulären Export, nicht aber für die enzymatische Aktivität als solche notwendig ist. Die vorliegende Erfindung umfaßt somit weiterhin auch für das reife Protein (ohne Signalpeptid) codierende Sequenzen in operativer Verknüpfung mit heterologen Signalsequenzen, insbesondere mit prokaryontischen Signalsequenzen, wie etwa bei E.L. Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie, VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim, BRD, (1985), S. 256 beschrieben.

Die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 9 codiert für eine Variante der Isomerase aus *Protaminobacter rubrum*. Die Nucleotidsequenz SEQ ID NO. 11 codiert für die vollständige Isomerase aus dem Isolat SZ 62. Die Nucleotidsequenz SEQ ID NO. 13 codiert für den Großteil der Isomerase aus dem Mikroorganismus MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619).

Neben den in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 oder SEQ ID NO. 13 gezeigten Nukleotidsequenzen und einer dieser Sequenzen im Rahmen der Degeneration

- 4 -

des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenzen umfaßt die vorliegende Erfindung auch noch eine DNA-Sequenz, die mit einer dieser Sequenzen hybridisiert, vorausgesetzt, daß sie für ein Protein codiert, das zur Isomerisierung von Saccharose in der Lage ist. Der Begriff "Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104) verwendet. Gemäß vorliegender Erfindung spricht man von einer Hybridisierung, wenn nach Waschen für 1 Stunde mit 1 x SSC und 0,1 % SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und besonders bevorzugt bei 68°C, insbesondere für 1 Stunde in 0,2 x SSC und 0,1 % SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und besonders bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Eine unter derartigen Waschbedingungen mit einer der in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einer damit im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nukleotidsequenz hybridisierende Nukleotidsequenz ist eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz.

Vorzugsweise weist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz

- (a) eine der in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 oder SEQ ID NO. 13 gezeigten Nukleotidsequenzen gegebenenfalls ohne den Signalpeptidcodierenden Bereich oder
- (b) eine zu den Sequenzen aus (a) mindestens 70 % homologe Nukleotidsequenz auf.

Vorzugsweise weist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz auch eine mindestens 80 % homologe Nukleotidsequenz zu den konservierten Teilbereichen der in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 oder SEQ ID NO. 13 gezeigten Nukleotidsequenzen auf. Diese konservierten Teilbereiche sind insbesondere von Nukleotid 139 - 186, Nukleotid 256 - 312, Nukleotid 328 - 360, Nukleotid 379 - 420 oder/und Nukleotid 424 - 444 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz.

- 5 -

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz eine mindestens 80 % homologe, insbesondere eine mindestens 90 % homologe Nukleotidsequenz zu den Teilbereichen

(a) Nukleotid 139 - 155 oder/und

(b) Nukleotid 625 - 644

der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz auf.

Oligonukleotide, die aus den obigen Sequenzbereichen abgeleitet sind, haben sich als Primer zur PCR-Amplifikation von Isomerase-Fragmenten aus der genomischen DNA einer Vielzahl getesteter Mikroorganismen, z.B. *Protaminobacter rubrum* (CBS 547, 77), *Erwinia rhapontici* (NCPBP 1578), Isolat SZ 62 und *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (FERM 11808) bewährt.

Besonders bevorzugt werden zu diesem Zweck die folgenden Oligonukleotide, gegebenenfalls in Form von Gemischen verwendet, wobei die in Klammern befindlichen Basen alternativ vorhanden sein können:

Oligonukleotid I (17 nt):

5'-TGGTGGAA(A,G)GA(G,A)GCTGT-3'

Oligonukleotid II (20 nt):

5'-TCCCAGTTCAG(G,A)TCCGGCTG-3'

Das Oligonukleotid I ist aus den Nukleotiden 139-155 von SEQ ID NO. 1 abgeleitet und das Oligonukleotid II ist aus der zu den Nukleotiden 625 - 644 komplementären Sequenz von SEQ ID NO. 1 abgeleitet. Die Unterschiede zwischen den homologen Teilbereichen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und den als Oligonukleotid I und Oligonukleotid II bezeichneten Sequenzen sind vorzugsweise jeweils maximal 2 Nukleotide und besonders bevorzugt jeweils maximal 1 Nukleotid.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die DNA-Sequenz eine mindestens

- 6 -

80 % homologe, insbesondere eine mindestens 90 % homologe Nukleotidsequenz zu den Teilbereichen von

(c) Nukleotid 995 - 1013 oder/und

(d) Nukleotid 1078 - 1094

der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz auf.

Oligonukleotide, die aus den obigen Sequenzbereichen abgeleitet sind, hybridisieren mit Saccharose-Isomerasegenen aus den Organismen *Protaminobacter rubrum* und *Erwinia rhapontici*. Besonders bevorzugt werden die folgenden Oligonukleotide, gegebenenfalls in Form von Gemischen, verwendet, wobei die in Klammern angegebenen Basen alternativ vorhanden sein können:

Oligonukleotid III (19 nt):

AAAGATGGCG(G,T)CGAAAAGA

Oligonukleotid IV (17 nt):

5'-TGGAATGCCTT(T,C)TTCTT-3'

Oligonukleotid III ist aus den Nukleotiden 995 - 1013 von SEQ ID NO. 1 abgeleitet und Oligonukleotid IV ist aus den Nukleotiden 1078 - 1094 von SEQ ID NO. 1 abgeleitet. Die Unterschiede zwischen den homologen Teilbereichen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und den als Oligonukleotid III und IV bezeichneten Sequenzen sind vorzugsweise jeweils maximal 2 Nukleotide und besonders bevorzugt jeweils maximal 1 Nukleotid.

Erfindungsgemäße Nukleotidsequenzen sind insbesondere aus Mikroorganismen der Gattungen *Protaminobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* und *Klebsiella* erhältlich. Spezifische Beispiele für solche Mikroorganismen sind *Protaminobacter rubrum* (CBS 547,77), *Erwinia rhapontici* (NCPPB 1578), *Serratia plymuthica* (ATCC 15928), *Serratia marcescens* (NCIB 8285), *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-521f (ATCC 10830a), *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619) *Agrobacterium radiobacter* MX-232 (FERM



- 7 -

12397 bzw. FERM BP 3620), Klebsiella subspezies und Enterobacter spezie. Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen können auf einfache Weise aus dem Genom der betreffenden Mikroorganismen z.B. unter Verwendung von Oligonukleotiden aus einem oder mehreren der konservierten Bereiche von SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 und SEQ ID NO. 13 durch Amplifikations- oder/und Hybridisierungs-Standardtechniken isoliert und charakterisiert werden. Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen durch eine PCR-Amplifikation der genomischen DNA des betreffenden Organismus unter Verwendung der Oligonucleotide I und II gewonnen. Auf diese Weise erhält man ein Teilfragment des betreffenden Saccharose-Isomerasegens, das anschließend als Hybridisierungssonde zur Isolierung des kompletten Gens aus einer Genbank des betreffenden Mikroorganismus verwendet werden kann. Alternativ können die Nukleotidsequenzen durch Herstellung einer Genbank aus dem jeweiligen Organismus und direkte Musterung dieser Genbank mit den Oligonukleotiden I, II, III oder/und IV gewonnen werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz enthält. Dieser Vektor kann ein beliebiger prokaryontischer oder eukaryontischer Vektor sein, auf dem die erfindungsgemäße DNA-Sequenz sich vorzugsweise unter Kontrolle eines Expressionssignals (Promotor, Operator, Enhancer etc.) befindet. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind chromosomale Vektoren wie etwa Bacteriophagen (z.B. Bacteriophage  $\lambda$ ) und extrachromosomale Vektoren wie etwa Plasmide, wobei zirkuläre Plasmidvektoren besonders bevorzugt sind. Geeignete prokaryontische Vektoren sind z.B. bei Sambrook et al., supra, Kapitel 1 - 4 beschrieben.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel eines erfindungsgemäßen Vektors ist das Plasmid pHWS 88, welches ein Saccharose-Isomerase-Gen von Protaminobacter rubrum unter Kontrolle des regulierbaren tac-Promotors trägt. Das Plasmid pHWS 88 wurde am

- 8 -

16. Dezember 1993 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland unter der Hinterlegungsnummer DSM 8824 gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrages hinterlegt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der erfindungsgemäße Vektor ein Plasmid, das in der Wirtszelle mit einer Kopienzahl von weniger als 10, besonders bevorzugt mit einer Kopienzahl von 1 bis 2 Kopien pro Wirtszelle vorliegt. Beispiele solcher Vektoren sind einerseits chromosomale Vektoren, wie etwa Bacteriophage  $\lambda$  oder F-Plasmide. Die Herstellung von F-Plasmiden, die das Saccharose-Isomerasegen enthalten, kann beispielsweise durch Transformation eines F-Plasmid-haltigen E.coli-Stamms mit einem, das Saccharose-Isomerasegen enthaltenden Transposon und anschließende Selektion auf rekombinante Zellen erfolgen, in denen das Transposon in das F-Plasmid integriert hat. Ein Beispiel für ein derartiges rekombinantes Transposon ist das Plasmid pHWS 118, welches das Transposon Tn 1721 Tet enthält und durch Klonierung eines das Saccharose-Isomerase-Gen enthaltenden DNA-Fragments aus dem oben beschriebenen Plasmid pHWS 88 in das Transposon pJOE 105 (DSM 8825) hergestellt wurde.

Andererseits kann der erfindungsgemäße Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor (z.B. YIp, YEp etc.) oder ein für höhere Zellen geeigneter Vektor (z.B. ein Plasmidvektor, viraler Vektor, Pflanzenvektor) sein. Derartige Vektoren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie geläufig, so daß hier nicht näher darauf eingegangen werden muß. Insbesondere wird in diesem Zusammenhang auf Sambrook et al., supra, Kapitel 16 verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. In einer Ausführungsform ist diese Zelle eine prokaryontische Zelle, vorzugs-

- 9 -

weise eine gram-negative prokaryontische Zelle, besonders bevorzugt eine Enterobakterienzelle. Dabei kann einerseits eine Zelle verwendet werden, die kein eigenes Saccharose-Isomerase-Gen enthält, wie z.B. E.coli, andererseits können aber auch Zellen verwendet werden, die bereits ein solches Gen auf ihrem Chromosom enthalten, z.B. die oben als Quelle für Saccharose-Isomerasegene genannten Mikroorganismen. Bevorzugte Beispiele für geeignete prokaryontische Zellen sind E.coli-, Protaminobacter rubrum- oder Erwinia rhapontici-Zellen. Die Transformation prokaryontischer Zellen mit exogenen Nukleinsäuresequenzen ist einem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie geläufig (vgl. z.B. Sambrook et al., supra, Kapitel 1 - 4).

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die erfindungsgemäße Zelle jedoch auch eine eukaryontische Zelle sein, wie etwa eine Pilzzelle (z.B. Hefe), eine tierische oder eine pflanzliche Zelle. Verfahren zur Transformation bzw. Transfektion eukaryontischer Zellen mit exogenen Nukleinsäuresequenzen sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie ebenfalls geläufig und brauchen hier nicht näher erläutert zu werden (vgl. z.B. Sambrook et al., Kapitel 16).

Die Erfindung betrifft auch ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität wie oben definiert, das von einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz codiert ist. Vorzugsweise umfaßt dieses Protein

- (a) eine der in SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 12 oder SEQ ID NO. 14 gezeigten Aminosäuresequenzen gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-bereich oder
- (b) eine zu den Sequenzen aus (a) mindestens 80 % homologe Aminosäuresequenz.

Die in SEQ ID NO. 4 gezeigte Aminosäuresequenz umfaßt die vollständige Saccharose-Isomerase aus Protaminobacter rubrum. Das Signalpeptid reicht von Aminosäure 1 - 33. Das reife

- 10 -

Protein beginnt mit Aminosäure 34. Die in SEQ ID NO. 5 gezeigte Aminosäuresequenz umfaßt den N-terminalen Abschnitt der Saccharose-Isomerase aus *Erwinia rhapontici*. Das Signalpeptid reicht von Aminosäure 1 - 36. Das reife Protein beginnt mit Aminosäure 37. Die in SEQ ID NO. 6 gezeigte Aminosäuresequenz umfaßt einen Abschnitt der Saccharose-Isomerase aus dem Mikroorganismus SZ 62. In Fig. 1 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Isomerasen aus *P. rubrum*, *E. rhapontici* und SZ 62 gezeigt.

Die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 10 umfaßt eine Variante der Isomerase aus *P. rubrum*. Die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 12 umfaßt die vollständige Isomerase aus SZ 62. Dieses Enzym hat eine hohe Aktivität bei 37°C und produziert nur einen sehr geringen Anteil an Monosacchariden. Die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 14 umfaßt einen Großteil der Isomerase aus MX-45. Dieses Enzym produziert ca. 85% Trehalulose und 13% Palatino-se.

Besonders bevorzugt weist das erfindungsgemäße Protein eine mindestens 90 % homologe Aminosäuresequenz zu konservierten Teilbereichen aus den in SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 12 oder SEQ ID NO. 14 gezeigten Aminosäuresequenzen auf, insbesondere in Teilbereichen von

- (a) Aminosäure 51 - 149,
- (b) Aminosäure 168 - 181,
- (c) Aminosäure 199 - 250,
- (d) Aminosäure 351 - 387 oder/und
- (e) Aminosäure 390 - 420

der in SEQ ID NO. 4 gezeigten Aminosäuresequenz auf.

Mittels der oben genannten DNA-Sequenzen, Vektoren, transformierten Zellen und Proteinen ist die Bereitstellung einer Saccharose-Isomerase-Aktivität ohne störende enzymatische Nebenaktivitäten auf einfache Weise möglich.

- 11 -

Hierzu kann einerseits die Saccharose-Isomerase durch rekombinante DNA-Technologie als Bestandteil eines Extrakts aus dem Wirtsorganismus oder in isolierter und gereinigter Form (z.B. durch Expression in E.coli) erhalten werden. Dieses vorzugsweise gereinigte und isolierte Saccharose-Isomerase-Enzym kann z.B. in immobilisierter Form zur technischen Herstellung von akariogenen Zuckern wie etwa Trehalulose oder/und Palatinose durch Umsetzung von Saccharose in einem Enzymreaktor verwendet werden. Die Immobilisierung von Enzymen ist einem Fachmann geläufig und muß an dieser Stelle nicht ausführlich beschrieben werden.

Andererseits kann die Herstellung von akariogenen Zuckern aus Saccharose auch in einem vollständigen Mikroorganismus, vorzugsweise in immobilisierter Form, erfolgen. Durch Klonierung des oben genannten Saccharose-Isomerasegens in einen Organismus ohne bzw. mit reduziertem Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel (d.h. in einem Organismus, der nicht in der Lage ist, die oben genannten Zucker signifikant abzubauen) kann ein neuer Organismus erzeugt werden, der durch Einführung exogener DNA zur Herstellung von akariogenen Disacchariden ohne nennenswerte Bildung von Monosacchariden in der Lage ist. Zur Einführung des Saccharose-Isomerasegens eignet sich somit einerseits ein Organismus, der Palatinose oder/und Trehalulose nicht verwerten kann (z.B. E.coli, Bacillus, Hefe) und andererseits ein Organismus, der grundsätzlich zur Verwertung von Palatinose oder/und Trehalulose in der Lage wäre, aber durch ungezielte oder gezielte Mutation einen reduzierten Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel aufweist.

Der Begriff "reduzierter Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß eine ganze Zelle des betreffenden Organismus bei der Verwertung von Saccharose als C-Quelle akariogene Disaccharide erzeugt und diese aber nur in geringem Umfang metabolisch verwerten kann, z.B. indem sie zu Monosacchariden abgebaut werden. Vorzugsweise erzeugt der Organismus weniger als 2,5 %,

- 12 -

besonders bevorzugt weniger als 2 %, am meisten bevorzugt weniger als 1 % Glucose plus Fructose auf Basis der Summe von akariogenen Disacchariden und Monosaccharidabbauprodukten bei einer Temperatur von 15 - 65°C, insbesondere von 25 - 55°C.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Zelle, die mindestens eine für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codierende DNA-Sequenz enthält und einen wie oben definierten reduzierten Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel aufweist. Eine derartige Zelle erzeugt höhere Anteile der nicht-kariogenen Disaccharide Trehalulose oder/und Palatinose und verringerte Mengen an den störenden Nebenprodukten Glucose bzw. Fructose.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die Reduzierung des Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsels durch teilweise oder vollständige Hemmung der Expression von Invertase- oder/und Palatinasegenen erfolgen, die für den intrazellulären Abbau von Palatinose oder/und Trehalulose verantwortlich sind. Diese Hemmung der Genexpression kann beispielsweise durch zielgerichtete Mutagenese oder/und Deletion der betroffenen Gene erfolgen. Eine zielgerichtete Mutation des in SEQ ID NO. 7 gezeigten Palatinasegens oder des in SEQ ID NO. 15 gezeigten Palatinose-Hydrolase-Gens kann beispielsweise durch Einführung eines zur homologen chromosomalen Rekombination geeigneten Vektors, der ein mutiertes Palatinasegen trägt, und Selektion von Organismen erfolgen, in denen eine derartige Rekombination stattgefunden hat. Das Prinzip der Selektion durch genetische Rekombination wird bei E.L. Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (1985), VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim, BRD, S. 320 ff. erläutert.

Weiterhin können erfindungsgemäße Organismen mit reduziertem Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel auch durch unspezifische Mutagenese aus geeigneten Ausgangsorganismen und Selektion der Palatinase-Defektmutanten erhalten werden. Ein

- 13 -

Beispiel für eine derartige Palatinase-Defektmutante ist der Protaminobacter rubrum-Stamm SZZ 13, der am 29. März 1994 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, unter der Hinterlegungsnummer DSM 9121 gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrags hinterlegt wurde. Dieser Mikroorganismus wurde durch unspezifische Mutagenese von P. rubrum-Wildtypzellen mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin hergestellt und zeichnet sich dadurch aus, daß er die nicht-kariogenen Zucker Trehalulose und Palatinose nicht mehr in Glucose und Fructose spalten kann. Die Selektion solcher Mutanten kann z.B. durch Verwendung von MacConkey-Palatinase-Medien oder Minimalsalzmedien mit Palatinose oder Glucose als einziger C-Quelle erfolgen. Die Mutanten, die auf MacConkey-Palatinose-Medium (MacConkey-Agar-Base von Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA (40 g/l) und 20 g/l Palatinose) weiß sind oder auf Minimalsalzmedien mit Glucose als einziger C-Quelle, aber nicht auf entsprechenden Medien mit Palatinose als einziger C-Quelle wachsen, werden als Palatinase-Defekt-Mutanten identifiziert.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codieren, wobei man eine Genbank aus einem Spenderorganismus, der eine für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codierende DNA-Sequenz enthält, in einem geeigneten Wirtsorganismus anlegt, die Klone der Genbank untersucht und die Klone isoliert, die eine für ein Protein mit Saccharose-Isomerase-Aktivität codierende Nukleinsäure enthalten. Die auf diese Weise isolierten, für Saccharose-Isomerase codierenden Nukleinsäuren können wiederum zur Einführung in Zellen wie oben beschrieben verwendet werden, um neue Produzentenorganismen von akariogenen Zuckern bereitzustellen.

Bei diesem Verfahren wählt man als Wirtsorganismus vorzugsweise einen Organismus, der keine eigenen funktionellen Gene

- 14 -

für den Palatinosestoffwechsel, insbesondere keine funktionellen Palatinase- oder/und Invertasegene besitzt. Ein bevorzugter Wirtsorganismus ist E.coli. Zur Erleichterung der Charakterisierung von Palatinose-produzierenden Klonen können bei der Untersuchung der Klone der Genbank Saccharose-spaltende Klone und die darin enthaltenen, vom Spenderorganismus stammenden DNA-Sequenzen isoliert und in einem Galactose nicht verwertenden E.coli-Stamm transformiert werden, der als Screeningstamm für die Klone der Genbank eingesetzt wird.

Andererseits kann die Untersuchung der Klone der Genbank auf DNA-Sequenzen, die für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codieren, auch unter Verwendung von Nukleinsäuresonden erfolgen, die aus den Sequenzen SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 bzw. SEQ ID NO. 13 abgeleitet sind, die für die Saccharose-Isomerase-Gene aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici* und dem Isolat SZ 62 codieren. Besonders bevorzugt verwendet man als Sonden ein durch PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden I und II als Primer gewonnenes DNA-Fragment bzw. die Oligonukleotide III oder/und IV.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von nicht-kariogenen Zuckern, insbesondere Trehalulose oder/und Palatinose, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man zur Produktion der Zucker

- (a) ein Protein mit Saccharose-Isomerase-Aktivität in isolierter Form,
- (b) einem Organismus, der mit einer DNA-Sequenz, die für Protein mit Saccharose-Isomerase-Aktivität codiert, oder einem, mindestens eine Kopie dieser DNA-Sequenz enthaltenden Vektor transformiert ist,
- (c) einen Organismus, der mindestens eine für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codierende DNA-Sequenz enthält und einen reduzierten Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel aufweist, oder/und



- 15 -

- (d) einen Extrakt aus einer derartigen Zelle bzw. einem derartigen Organismus verwendet.

Die Durchführung des Verfahrens erfolgt im allgemeinen dadurch, daß man das Protein, den Organismus bzw. den Extrakt in einem geeigneten Medium mit Saccharose unter solchen Bedingungen in Kontakt bringt, bei denen die Saccharose durch die Saccharose-Isomerase mindestens teilweise in akariogene Disaccharide umgewandelt wird. Anschließend werden die akariogenen Disaccharide aus dem Medium oder dem Organismus gewonnen und auf bekannte Weise aufgereinigt.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird der Organismus, das Protein oder der Extrakt in immobilisierter Form verwendet. Die Immobilisierung von Proteinen (in reiner Form oder in Extrakten) erfolgt vorzugsweise über Kopplung von reaktiven Seitengruppen (z.B.  $\text{NH}_2$ -Gruppen) an einen geeigneten Träger. Die Immobilisierung von Zellen erfolgt z.B. in einer Natriumalginat/Calciumchlorid-Lösung. Ein Überblick über geeignete Methoden zur Immobilisierung von Zellen und Proteinen wird z.B. bei I. Chibata (Immobilized Enzymes, John Wiley and Sons, New York, London, 1978) gegeben.

Bei Verwendung einer mit der Saccharose-Isomerase-Gen transformierten Zelle kann die Produktionsrate von akariogenen Zuckern gegenüber bekannten Organismen durch Erhöhung der Anzahl von Genkopien in der Zelle oder/und durch Erhöhung der Expressionsrate bei einer Kombination mit starken Promotoren steigern. Weiterhin kann durch Transformation einer Zelle, die nicht oder nur in beschränktem Ausmaß zur Verwertung von akariogenen Zuckern in der Lage ist, mit dem Saccharose-Isomerase-Gen eine transformierte Zelle erzeugt werden, mit deren Hilfe akariogene Zucker, insbesondere Palatinose oder/und Trehalulose, ohne oder mit weniger Nebenprodukten gewonnen werden können.

- 16 -

Bei Verwendung eines Mikroorganismus mit reduziertem Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel, der bereits ein funktionelles Saccharose-Isomerase-Gen enthält, ist die Transformation mit einem exogenen Saccharose-Isomerase-Gen nicht essentiell, kann aber zur Ausbeuteverbesserung durchgeführt werden.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung noch eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit Palatinase- bzw. Palatinose-Hydrolase-Aktivität codiert und

- (a) eine der in SEQ ID NO. 7 oder SEQ ID NO. 15 gezeigten Nukleotidsequenzen,
- (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder
- (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie der oben genannten DNA-Sequenzen enthält und eine Zelle, die mit einer DNA-Sequenz oder einem Vektor, wie oben genannt, transformiert ist. Ebenfalls von der Erfindung umfaßt wird ein Protein mit Palatinase-Aktivität, das von einer DNA-Sequenz, wie oben angegeben, codiert ist und das vorzugsweise eine der in SEQ ID NO. 8 oder SEQ ID NO. 16 gezeigten Aminosäuresequenzen aufweist.

Die in SEQ ID NO. 8 gezeigte Palatinase aus *P. rubrum* unterscheidet sich von bekannten Saccharose-spaltenden Enzymen dadurch, daß sie die von bekannten Enzymen nicht gespaltenen Saccharose-Isomere, insbesondere Palatinose, spaltet.

Die in SEQ ID NO. 16 gezeigte Aminosäuresequenz umfaßt eine Palatinose-Hydrolase aus MX-45, die Palatinose unter Bildung von Fructose und Glucose spaltet. Das für dieses Enzym codierende Gen ist in SEQ ID NO. 15 dargestellt und ist im Genom von MX-45 5'-seitig des in SEQ ID NO. 13 gezeigten Isomerasegens lokalisiert.

- 17 -

Weiterhin wird die Erfindung durch folgende Sequenzprotokolle und Figuren beschrieben:

SEQ ID NO.1 zeigt die Nukleotidsequenz des für die Saccharose-Isomerase aus *Protaminobacter rubrum* codierenden Gens. Die für das Signalpeptid codierende Sequenz endet bei Nukleotid Nr. 99.

SEQ ID NO.2 zeigt den N-terminalen Abschnitt der Nukleotidsequenz des für die Saccharose-Isomerase von *Erwinia rhapontici* codierenden Gens. Die für das Signalpeptid codierende Sequenz endet bei dem Nukleotid mit der Nr. 108.

SEQ ID NO.3 zeigt einen Abschnitt der Nukleotidsequenz des für die Saccharose-Isomerase aus dem Isolat SZ 62 codierenden Gens.

SEQ ID NO.4 zeigt die Aminosäuresequenz der Saccharose-Isomerase aus *Protaminobacter rubrum*.

SEQ ID NO.5 zeigt den N-terminalen Abschnitt der Aminosäuresequenz der Saccharose-Isomerase aus *Erwinia rhapontici*.

SEQ ID NO.6 zeigt einen Abschnitt der Aminosäuresequenz der Saccharose-Isomerase aus dem Isolat SZ 62.

SEQ ID NO.7 zeigt die Nukleotidsequenz für das Palatinasegen aus *Protaminobacter rubrum*.

SEQ ID NO.8 zeigt die Aminosäuresequenz der Palatinase aus *Protaminobacter rubrum*.

SEQ ID NO.9 zeigt die Nucleotidsequenz einer Variante des Saccharose-Isomerasegens aus *P. rubrum*.

SEQ ID NO. 10 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz.

- 18 -

SEQ ID NO. 11 zeigt die vollständige Nucleotidsequenz des Saccharose-Isomerasegens aus SZ 62.

SEQ ID NO. 12 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz.

SEQ ID NO. 13 zeigt den Großteil des Saccharose-Isomerasegens aus *Pseudomonas mescacidophila* (MX-45).

SEQ ID NO. 14 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz.

SEQ ID NO. 15 zeigt das Palatinose-Hydrolase-Gen aus *Pseudomonas mesoacidophila* (MX-45).

SEQ ID NO. 16 zeigt die korrespondierende Aminosäuresequenz.

Fig. 1 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen den Saccharose-Isomerasen aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici* und dem Isolat SZ 62,

Fig. 2 das Klonierungsschema zur Herstellung des rekombinanten Plasmids pHWS 118, das das Saccharose-Isomerase-Gen auf dem Transposon Tn 1721 enthält,

Fig. 3 das Schema zur Herstellung von *E.coli*-Transkonjuganten, die das Saccharose-Isomerase-Gen auf einem F-Plasmid enthalten und

Fig. 4 zeigt einen Vergleich zwischen den von *P. rubrum*-Wildtypzellen und Zellen der *P. rubrum* Mutante SZZ 13 erzeugten Sacchariden.

Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung.

- 19 -

BEISPIEL 1

Isolierung des Saccharose-Isomerase-Gens aus *Protaminobacter rubrum*

Gesamt-DNA aus dem Organismus *Protaminobacter rubrum* (CBS 574, 77) wurde partiell mit *Sau3A I* verdaut. Aus dem resultierenden Fragmentgemisch wurden Fragmentscharen der Größe von ca. 10 kbp durch Elution nach gelelektrophoretischer Auftrennung gewonnen und in ein mit *BamHI* geöffnetes Derivat des Lambda EMBL4-Vektor-Derivats  $\lambda$  RESII (J. Altenbuchner, Gene 123 (1993), 63-68) ligiert. Durch Transfektion von *E. coli* und Umwandlung der Phagen in Plasmide gemäß obigem Zitat wurde eine Genbank hergestellt. Ein Screening der Kanamycin-resistenten Kolonien dieser Genbank erfolgte mit dem aus der Sequenz des N-Terminus der reifen Isomerase abgeleiteten radioaktiv markierten Oligonukleotids S214 durch Hybridisierung:

S214: 5'-ATCCCGAAGTGGTGGGAAGGAGGC-3'

T A A A A

Anschließend erfolgte eine Isolierung der Plasmid-DNA aus den positiv reagierenden Kolonien nach entsprechender Kultivierung. Aus einem auf diese Weise erhaltenen Plasmid pKAT 01 wurde nach Erstellung einer Restriktionskarte geeignete Subfragmente sequenziert und somit die komplette, in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz der für die Isomerase codierenden DNA erhalten. Die davon abgeleitete Aminosäuresequenz entspricht vollständig der durch Sequenzierung (Edmann-Abbau) gewonnenen Peptidsequenz der reifen Isomerase. Im nicht-codierenden 3'-Bereich dieses Isomerasegens befindet sich eine Schnittstelle für *SacI*, im nicht-codierenden 5'-Bereich eine Schnittstelle für *HindIII*. Dies ermöglicht die Subklonierung des intakten Isomerasegens in den Vektor pUCBM 21 (Derivat des Vektors pUC 12, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), der zuvor mit den genannten Enzymen vorgespalten worden war. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pHWS

- 20 -

34.2 und verleiht den es tragenden E.coli-Zellen die Fähigkeit zur Synthese von Saccharose-Isomerase.

Eine Variante des Saccharose-Isomerasegens aus *P. rubrum* besitzt die in SEQ ID NO. 9 gezeigte Nucleotidsequenz.

## BEISPIEL 2

Klonierung und Expression der Saccharose-Isomerase aus *P. rubrum* in *E.coli*

### 1. Herstellung des Plasmids pHWS88

Aus dem Plasmid pHWS 34.2 wurde durch Verwendung eines Oligonukleotids S434 mit der Sequenz 5'-CGGAATTCTTATGCCCCGTCAAGGA-3' der nicht-codierende 5'-Bereich des Saccharose-Isomerasegens unter gleichzeitiger Einfügung einer EcoRI-Schnittstelle (GAATTC) entfernt. Das so entstehende Derivat des Isomerasegens wurde mit BstE II behandelt, das überhängende BstE II-Ende mit S1-Nuklease abgedaut und anschließend mit EcoRI nachverdaut. Das auf diese Weise behandelte Isomerasegen wurde in den mit EcoRI und SmaI vorbehandelten Vektor pBTacI (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) kloniert. Der resultierende Vektor pHWS 88 (DSM 8824) enthält das modifizierte Isomerasegen mit einer vorangestellten EcoRI-Restriktionsstelle vor dem ATG-Startkodon und den 3'-Bereich des Isomerasegens bis zur S1-verkürzten BstE II-Schnittstelle. Dieser Vektor verleiht unter Induktion mit IPTG den dieses Plasmid tragenden Zellen die Fähigkeit zur Isomeraseproduktion sowie die Resistenz gegen Ampicillin (50 bis 100 µg/ml). Vorzugsweise werden zur Erzeugung von Isomerase *E.coli*-Wirtszellen verwendet, die den lac-Repressor überproduzieren.

### 2. Herstellung des Plasmids pHWS118::Tn1721Tet

Die Genkasette für die Saccharose-Mutase wurde in ein Transposon eingebaut.

- 21 -

Dies geschah durch Einklonierung eines SphI/HindIII-DNA-Fragments aus dem Plasmid pHWS88, welches das Saccharose-Mutase-Gen unter Kontrolle des tac-Promotors trägt, in das Plasmid pJOE105, auf dem sich das Transposon Tn 1721 befindet. Das Plasmid pJOE105 wurde am 16. Dezember 1993 bei DSM unter der Hinterlegungsnummer DSM 8825 gemäß den Vorschriften des Budapestervertrages hinterlegt. Das resultierende Plasmid pHWS118, auf dem sich das Saccharose-Mutasegen unter Kontrolle des regulierbaren tac-Promotors befindet, wurde verwendet, um einen F'-Plasmidhaltigen E.coli-Stamm zu transformieren. Fig. 2 zeigt das Klonierungsschema zur Herstellung von pHWS 118 aus pHWS88 und pJOE 105.

Die Herstellung von E.coli Transkonjuganten, die das Saccharose-Mutasegen enthalten, erfolgte nach dem in Fig. 3 beschriebenen Schema. Hierzu wurde als erstes der F'-tragende E.coli-Stamm CSH36 (J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1972), S. 18), der den durch das F'-Plasmid vermittelten Phänotyp Lac<sup>+</sup> trägt, mit dem Nalidixinsäure-resistenten E.coli-Stamm JM108 (Sambrook et al., supra, S. A9-A13) gekreuzt. Durch Selektion auf Minimalmedium, dem Laktose, Prolin und Nalidixinsäure zugesetzt wurde, wurde ein F'-Lac-tragender Transkonjugant erhalten. Dieser wurde zusätzlich mit dem Iq-Plasmid FDX500 (Brinkmann et al., Gene 85 (1989), 109-114) transformiert, um eine Kontrolle des Saccharose-Mutase-Gens durch den tac-Promotor zu ermöglichen.

Der so vorbereitete Transkonjugant wurde mit dem Saccharose-Mutase-Gen tragenden Transposonplasmid pHWS118 transformiert. Zur Selektion von Transkonjuganten wurde in den Streptomycin-resistenten E.coli-Stamm HB101 (Boyer und Roulland-Dussoix, J.Mol.Biol 41 (1969), 459-472) gekreuzt. Der Transfer der durch das Transposon vermittelten Tetracyclin-Resistenz war nur möglich nach Transposition des modifizierten Tn1721Tet von dem nicht konjugierbaren und nicht mobilisierbaren Plasmid pHWS118 auf das konjugierbare F'-Plasmid. Die Übertragung des F'-Plasmids mit dem modifizierten Transposon in HB101 wurde

- 22 -

auf LB-Platten mit Streptomycin und Tetracyclin selektioniert und auf Ampicillin- und Nalidixinsäure-Platten nachgetestet.

### 3. Expression der Saccharose-Isomerase in E.coli

Untersuchungen zur Enzymproduktion solcher F'-Plasmid-tragenden E.coli-Zellen zeigten, daß Saccharose-Mutase-Protein produziert werden konnte. F'-Plasmid-haltige HB101-Zellen, die kein zusätzliches Lac-Repressor-Plasmid trugen (z.B. K1/1 oder K1/10), produzierten Saccharose-Mutase-Protein mit und ohne den Induktor Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) in gleichen Mengen. Die Produktivitäten von drei Transkonjuganten K1/1, K1/10 und K1/4 sind in der folgenden Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Saccharose Mutase Aktivität  
in E.coli HB101 (F'::Tn1721[Mutase])

Stamm	U/mg Mutase nach 4 Stunden ohne Induktion	U/mg Mutase nach 4 Stunden Induktion mit 50 $\mu$ M IPTG
K1/1	1,0	1,2
K1/10	0,9	1,1
K1/4	0	1,6

Während der Produktion an Saccharose-Mutase-Protein konnte ein normales Wachstum der E.coli-Zellen beobachtet werden.

Erfolgte das Einbringen des Saccharose-Mutase-Gens in das F'-Plasmid in Gegenwart des Repressor-codierenden Plasmids pFDX500 (vgl. Transkonjugante K1/4), so wurde die Enzymproduktion durch den Induktor IPTG kontrollierbar. Während ohne IPTG keine enzymatische Aktivität gemessen wurde, konnte nach 4



- 23 -

Stunden Induktion eine Produktion des Saccharose-Mutase-Proteins von ca. 1,6 U/mg erhalten werden.

Eine Wachstumsbeeinträchtigung der Zellen konnte nicht beobachtet werden. Nach 4-stündiger Induktion erreichten die plasmidtragenden E.coli-Zellen eine Dichte von ca. 3 OD<sub>600</sub>.

Es wurden bis zu 1,6 U/mg Saccharose-Mutase-Aktivität in transformierten E.coli gemessen. Die Syntheseleistung ist mit der von P. rubrum vergleichbar. Die Analyse des produzierten Enzyms durch SDS-Gelelektrophorese gibt keinen Hinweis auf inaktive Proteinaggregate. Die Bande des Saccharose-Mutase-Proteins war mit Coomassie-Färbung nur schwach sichtbar und nur deutlich im Westernblot detektierbar. Die Stärke der Proteinbande und gemessene enzymatische Aktivität waren bei der Produktion der Saccharose-Mutase in E.coli korrelierbar.

### BEISPIEL 3

Isolierung des Saccharose-Isomerase-Gens aus *Erwinia rhapontici*

Es wurde auf gleiche Weise wie in Beispiel 1 beschrieben durch Restriktionsspaltung von Gesamt-DNA aus *Erwinia rhapontici* (NCPFB 1578) eine Genbank erzeugt.

Unter Verwendung der Primergemische 5'-TGGTGGAAAGAAGCTGT-3'

und

G G

5'-TCCCAGTTCAGGTCCGGCTG-3' wird durch eine PCR-Amplifikation

A

ein DNA-Fragment erhalten, mit dessen Hilfe das Mutasegen enthaltende Kolonien durch Hybridisierung identifiziert werden können.

Auf diese Weise wurde ein positiver Klon pSST2023 gefunden, der ein 1305 Nukleotide langes Fragment des *Erwinia*-Isomerase-Gens enthält. Die Nukleotidsequenz dieses Fragments ist in SEQ ID NO. 2 dargestellt.

- 24 -

Im Sequenzvergleich mit dem Protaminobacter-Gen ergibt sich für den gesamten Genabschnitt unter Einbeziehung des Signalpeptidbereichs eine Identität von 77,7 % und eine Ähnlichkeit von 78 %, auf Aminosäure-Ebene eine Identität von 83,4 % bzw. eine Ähnlichkeit von 90,3 %.

Die Sequenzunterschiede konzentrieren sich hauptsächlich auf den Signalpeptidbereich. Deshalb sollte zum Vergleich ausschließlich der für die eigentliche Mutase-Aktivität verantwortliche Enzym-codierende Bereich, ohne Signalpeptid, betrachtet werden. Unter diesen Gesichtspunkten ergibt sich auf Nukleotid-Ebene eine Identität bzw. Ähnlichkeit von 79 %. Der Aminosäure-Sequenzvergleich (Fig. 1) in diesem Abschnitt weist 87,9 % identische Aminosäuren auf. Von 398 Aminosäuren (dies entspricht 71 % des gesamten Enzyms) der Erwinia-Mutase sind 349 gleich wie bei Protaminobacter. Von 48 ausgetauschten Aminosäuren weisen 25 eine starke Ähnlichkeit auf, so daß sich insgesamt auf AS-Ebene eine Ähnlichkeit von 94 % ergibt. Die AS-Austausche konzentrieren sich hauptsächlich auf die Region zwischen Aminosäure 141 und 198. Vor diesem Bereich liegt eine Folge von 56 konservierten Aminosäuren. Auch andere Abschnitte weisen eine besonders hohe Konservierung auf (vgl. Fig. 1).

Diese Daten zeigen, daß für den bisher klonierten und sequenzierten Abschnitt insgesamt eine sehr starke Konservierung der beiden Mutasen aus Erwinia und Protaminobacter gegeben ist.

#### Identität des klonierten Mutase-Gens aus Erwinia

Für ein Rehybridisierungsexperiment mit genomischer Erwinia-DNA wurde als Sonde das ca. 500 bp große SspI/EcoRI-Fragment aus pSST2023 ausgewählt. Dieses Fragment wurde nach Digoxigenin-Markierung zur Hybridisierung mit Erwinia-DNA bei hoher Stringenz (68°C) eingesetzt. Mit SspI/EcoRI-geschnittener Erwinia-Gesamt-DNA ergab sich ein eindeutiges Hybridisierungssignal in erwarteter Größe von ca. 500 bp. Erwinia-DNA,

- 25 -

welche ausschließlich mit SspI geschnitten wurde, ergab ein Hybridisierungssignal von ca. 2 kb.

Durch die erfolgreiche Rehybridisierung von pSST2023 mit genomischer Erwinia-DNA konnte abgesichert werden, daß der in pSST2023 klonierte Mutase-Bereich aus Erwinia rhapontici entstammt.

#### Klonierung des C-terminalen Teilfragments der Erwinia-Mutase

Das bisher klonierte N-terminale Teilfragment des Erwinia-Mutase-Gens besitzt eine Größe von 1,3 kb und weist die in SEQ ID NO.2 gezeigte Nukleotidsequenz auf. Da für das gesamte Erwinia-Gen von einer nahezu identischen Größe wie für das bekannte Protaminobacter-Gen (1,8 kb) ausgegangen werden kann, fehlt im C-terminalen Bereich des Erwinia-Gens ein ca. 500 bp-Abschnitt.

Für die Klonierung des Erwinia-C-Terminus wurde das ca. 2 kb große SspI-Fragment aus Erwinia-Gesamt-DNA ausgewählt. Im SouthernBlot liefert dieses Fragment mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde aus pSST2023 ein eindeutiges Signal. Dieses 2 kb-SspI-Fragment überschneidet sich mit dem in pSST2023 bereits klonierten Bereich am 3'-Ende um ca. 500 bp. Seine Größe sollte zur vollständigen Klonierung des fehlenden Genabschnittes von ca. 500 bp ausreichend sein. Zur Identifikation gesuchter Klone eignet sich die Digoxigenin-markierte Fragment-Sonde SspI/EcoRI aus pSST2023.

#### BEISPIEL 4

##### Herstellung einer Protaminobacter Palatinase Defektmutante

Zellen von Protaminobacter rubrum (CBS 547, 77) wurden entsprechend der Methode von Adelberg et al. (Biochem. Biophys. Research Commun. 18 (1965), 788) modifiziert nach Miller, J., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 125-179 (1972)) mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

- 26 -

mutagenisiert. Zur Selektion von Palatinase-Defektmutanten wurden MacConkey-Palatinose-Medium (MacConkey-Agar-Base (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), 40 g/l unter Zusatz von 20 g/l Palatinose, sterilfiltriert, 25 mg/l Kanamycin) und Minimalsalzmedien (10,5 g  $K_2HPO_4$ , 4,5 g  $KH_2PO_4$ , 1 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,5 g Natriumcitrat  $\cdot$  2  $H_2O$ , 0,1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mg Thiamin, 2 g Palatinose oder Glucose, 25 mg Kanamycin und 15 g Agar pro Liter, pH 7,2) verwendet. Mutanten von *P. rubrum*, die auf MacConkey Palatinose-Medium weiß sind oder auf Minimalsalzmedium mit Glucose im Gegensatz zum gleichen Medium mit Palatinose wachsen, werden als Palatinase-Defekt-Mutanten identifiziert. In Zellextrakten aus den Mutanten kann die Enzymaktivität, Palatinose in Glucose und Fructose zu spalten (Palatinase-Aktivität), im Gegensatz zum Wildtyp nicht nachgewiesen werden. Züchtet man diese Zellen in Minimalsalzmedium mit 0,2 % Saccharose als einziger C-Quelle an, so ist im Gegensatz zu den Wildtypzellen, bei denen Palatinose nur transient in der Zeit von 4 bis 11 Stunden nach Kulturbeginn nachgewiesen werden kann, eine dauerhafte Akkumulation der Palatinose (Isomaltulose) nachweisbar. Übernachtskulturen in gleichem Medium enthalten im Falle der Wildtypzellen keine Palatinose, im Falle der auf diese Weise hergestellten Mutante SZZ 13 (DSM 9121) jedoch > 0,08 % Palatinose (siehe Fig. 4).

#### BEISPIEL 5

##### Immobilisierung von Mikroorganismen-Zellen

Von einer Abimpfung des entsprechenden Stammes werden Zellen mit 10 ml eines sterilen Nährsubstrats, bestehend aus 8 kg Dicksaft aus einer Zuckerfabrik (Trockensubstanzgehalt = 65 %), 2 kg Maisquellwasser, 0,1 kg  $(NH_4)_2HPO_4$  und 89,9 kg destilliertes Wasser, pH 7,2, abgeschwemmt. Diese Suspension dient als Impfgut für die Schüttelmaschinen-Vorkultur in 1 l-Kolben mit 200 ml Nährlösung der obigen Zusammensetzung. Nach einer 30-stündigen Inkubationszeit bei 29°C werden mit 10 Kolben (Gesamtinhalt 2 l) 18 l Nährlösung der obigen Zusammensetzung in einem 30 l Kleinfermenter beimpft und bei 29°C un-

- 27 -

ter Zufuhr von 20 l Luft pro Minute und einer Rührgeschwindigkeit von 350 Upm fermentiert.

Nach Erreichen von Keimzahlen über  $5 \times 10^9$  Keimen pro ml wird die Fermentation abgestellt und die Zellen durch Zentrifugation aus der Fermenterlösung abgeerntet. Die Zellen werden dann in eine 2 %ige Natriumalginatlösung suspendiert und durch Hineintropfen der Suspension in eine 2 %ige Calciumchloridlösung immobilisiert. Die entstandenen Immobilisatkugeln werden mit Wasser gewaschen und sind bei  $+4^\circ\text{C}$  mehrere Wochen lagerfähig.

Zellen der Palatinase-Defektmutante SZZ 13 (DSM 9121) zeigen bessere katalytische Eigenschaften bezüglich ihrer Produktsammensetzung als vergleichbare Zellen aus den bekannten Mikroorganismen *Protaminobacter rubrum* (CBS 547,77) und *Erwinia rhapontici* (NCPB 1578).

Es wurden Ganzzellen und Rohextrakte von SZZ 13 sowie ein wie oben hergestelltes Immobilisat von SZZ 13 in Calciumalginat hinsichtlich seiner Produktsammensetzung im Aktivitätstest bewertet. Vor dem eigentlichen Aktivitätstest wurde das Immobilisat in 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 vorgequollen.

Die Aktivitätsmessungen bei  $25^\circ\text{C}$  ergaben, daß bei der Mutante SZZ 13 keine Fructose und Glucose gefunden wurden, während bei *P. rubrum*-Wildtypzellen in Ganzzellen 2,6 % und im Rohextrakt 12,0 % Fructose und Glucose (auf Basis der gesamten Mono- und Disaccharide) gefunden wurden. Bei *E. rhapontici* wurden in Ganzzellen 4 % und im Rohextrakt 41 % Glucose und Fructose gefunden.

BEISPIEL 6

Isolierung des Saccharose-Isomerase-Gens aus anderen Mikroorganismen

Durch partiellen Verdau von genomischer DNA aus dem Isolat SZ62 (*Enterobacter spec.*), dem Organismus *Pseudomonas mesoacidophila* (MX-45) oder aus einem anderen Mikroorganismus und Einbringen der erhaltenen Fragmente in geeignete *E.coli*-Vektoren und Transformation wird eine Genbank gewonnen, deren Klone genomische Abschnitte zwischen 2 und 15 kb des Spenderorganismus enthalten.

Aus *E.coli*-Zellen, die diese Plasmide tragen, werden durch Plattierung auf McConkey-Palatinosemedium solche ausgewählt, die eine Rotfärbung der Kolonie aufweisen. Die in diesen Zellen enthaltene Plasmid-DNA wird in eine *E.coli*-Mutante überführt, die auf Galactose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann (z.B. ED 8654, Sambrook et al., supra, Seiten A9-A13). Diese transformierte Zelllinie ist zur Identifikation von Palatinoseproduzenten in der wie oben beschrieben hergestellten Genbank aus DNA des Spenderorganismus in der Lage.

Zur Identifikation der gesuchten Palatinose-bildenden Klone werden die Zellen der Genbank auf Minimalsalzmedien mit Galactose und Saccharose vereinzelt und angezogen. Nach Replikastempeln der Kolonien auf Platten mit dem gleichen Medium werden die Zellen durch Bedampfung mit Toluol abgetötet. Anschließend werden Zellen des Screeningstamms als Rasen in Minimalsalz-Weichagar ohne C-Quellenzusatz über die Kolonien der Genbank ausgebracht und bebrütet. Es entsteht signifikantes Wachstum der Zellen des Screeningstamms nur am Ort von Zellen der Genbank, die Palatinose produziert haben. Bei Prüfung der Zellen der Replikakontrolle ergibt sich der Gehalt an Isomerase.

Diese so identifizierten *E.coli*-Klone sind auf Palatinose als einziger C-Quelle im Medium nicht wachstumsfähig, zeigen im

- 29 -

Test der ganzen Zellen oder in Zellextrakten keine Fähigkeit zur Spaltung von Saccharose, bilden aber unter diesen Bedingungen und ohne Zusatz von Saccharose zum Medium bei der Anzucht Palatinose.

Alternativ können Isomerase-Klone auch unter Verwendung eines gemäß der Prozedur von Beispiel 3 hergestellten PCR-Fragments identifiziert werden.

Verwendet man Plasmid-DNA aus den so identifizierten E.coli--Klonen als Sonden zur Hybridisierung an Filtern mit immobilisierter DNA aus dem Spenderorganismus, lassen sich die Genbereiche, die Isomerasegene tragen, nachweisen und gezielt verfügbar machen.

Auf diese Weise wurde ein Klon identifiziert, der die in SEQ ID NO. 3 gezeigte Nukleotidsequenz mit der davon abgeleiteten und in SEQ ID NO. 6 gezeigten Aminosäuresequenz enthält. Ebenso wurde ein Isomerase-Klon aus DNA des Bakterienstamms *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (FERM 11808) gefunden.

Die vollständige Nucleotid- und Aminosäuresequenz der Saccharose-Isomerase aus SZ 62 sind in SEQ ID NO. 11 und 12 dargestellt. Ein Großteil der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Saccharose-Isomerase aus MX-45 sind in SEQ ID NO. 13 und 14 dargestellt.

#### BEISPIEL 7

##### Klonierung eines Palatinase-Gens

Die in Beispiel 1 hergestellte *Protaminobacter rubrum*-Genbank wurde mit dem aus der Sequenz des N-Terminus der isolierten Palatinase abgeleiteten radioaktiv markierten Oligonukleotidgemisch S433 mit der Sequenz CA(G,A)TT(C,T)GG(T,C)TA(C,T)GG-3' gemustert.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 30 -

Es wurde ein positiver Klon gefunden, aus dem ein Plasmid mit der Bezeichnung pKAT 203 isoliert wurde.

E.coli-Zellen, die das Plasmid pKAT203 tragen, sind zur Verstoffwechslung von Palatinose befähigt. Die im Aktivitätstest nachweisbare Spaltung von Palatinose in Glukose und Fructose läßt eine "Palatinase" vermuten.

Durch Sequenzierung von pKAT203-DNA mit dem Oligonukleotid S433 als Primer kann eine DNA-Sequenz erhalten werden, aus der nach Übersetzung in Aminosäuresequenzdaten die uns bekannten N-terminalen Aminosäuren abzulesen waren. Durch einen anschließenden Sequenzierungsschritt wurde ein offener Leserahmen erhalten.

#### Sequenzbestimmung des "Palatinase"-Gens

Zur weiteren Sequenzierung des "Palatinase"-Gens wurden Teilfragmente aus dem Plasmid pKAT 203 nach der Restriktionskarte ausgewählt, im M13-Phagensystem subkloniert und eine Sequenzierung der einzelsträngigen Phagen-DNA mit 'universal primer' 5'-GTTTCCCCAGTCACGAC-3' durchgeführt.

Werden die erhaltenen DNA-Sequenzdaten der einzelnen Fragmente unter Berücksichtigung überlappender Bereiche kombiniert, kann man einen durchgehenden Leserahmen für die "Palatinase" von 1360 Basenpaaren ermitteln (SEQ ID NO. 7).

Die Übersetzung dieser DNA-Sequenz in Aminosäuredaten ergibt ein Protein mit 453 Aminosäuren (SEQ ID NO. 8) und einem daraus abzuleitenden Molekulargewicht von ca. 50000 Da. Dies steht mit dem Befund in Einklang, daß durch Anreicherung der "Palatinase"-Aktivität eine Proteinfraction erhalten werden konnte, die im SDS-Gel eine Bande bei ca. 48000 Da aufwies. Im nativen Gel konnte die palatinosespaltende Aktivität einer Bande der Größe von ca. 150000 Da zugeschrieben werden.



- 31 -

### Homologievergleiche mit anderen bekannten Proteinen

Durch Vergleich der aus der DNA-Sequenz ableitbaren Aminosäureabfolge mit Daten, die in einer Genbank (SwissProt) gespeichert sind, war eine Homologie zu Melibiase aus E.coli (MelA) auffallend (in zwei Teilen: identity 32 %).

### BEISPIEL 8

Klonierung eines Palatinose-Hydrolase-Gens aus *P. mesoacidophila* MX-45

Aus der in Beispiel 6 hergestellten Genbank des Mikroorganismus *P. mesoacidophila* MX-45 wurde ein Gen mit der in SEQ ID NO. 15 gezeigten Nucleotidsequenz isoliert. Dieses Gen codiert für ein Protein mit der in SEQ ID NO. 16 gezeigten Aminosäuresequenz. Das Protein ist eine Palatinose-Hydrolase, welche die Spaltung von Palatinose unter Bildung von Fructose und Glucose katalysiert.

---

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 32 -

SEQ ID NO. 1

NAME: Pr Isomerase

LÄNGE: 1890 Basen

BESCHREIBUNG: Protaminobacter rubrum: Isomerase

\*\*\* S E Q U E N Z \*\*\*

```

1   ATGCCCCGTC AAGGATTGAA AACTGCACIA GCGATTTTTTC TAACCACATC ATTATGCATC
61  TCATGCCAGC AAGCCTTGG TACGCAACAA CCGTIGCTTA ACGAAAAGAG TATCGAACAG
121 TCGAAAACCA TACCTAAATG GTGGAAGGAG GCTGTTTTT ATCAGGTGTA TCGCGCTCC
181 TTAAAGACA CCAAGGAGA TGGCATOGGG GATATTAAAG GCATCATAGA AAAATTAGAC
241 TATCTAAAAG CCGTGGGGAT TGATGCCATT TGGATCAACC CACATTATGA TTCTCGAAC
301 ACGGATAATG GTTACGATAT ACGTGATTAT CGAAAATCA TGAAAGATA TGGCAOGATG
361 GAGGATTTTG ACGGCTGAT TTCIGAAATG AAAAAACGA ATATGCGGTT GATGATTGAT
421 GTGGTCATCA ACCACACCAG CGATCAAAAC GAATGGTTTG TTAAAAGTAA AAGCAGTAA
481 GATAATCCTT ATCGGGCTA TTATTTCTGG AAAGATGCTA AAGAAGGGCA GCGGCTAAT
541 AATTACCTT CATCTTTGG TGGCTOGGG TGGCAAAAAG ATGAAAAGAC CAATCAATAC
601 TACCTGCACT ATTTTGCTAA ACAACAGCCT GACCTAAACT GGGATAATOC CAAAGTCCGT
661 CAAGATCCTT ATGCAATGTT ACGTTTCTGG TTAGATAAAG GGTGTCTGG TTACGTTTTT
721 GATACGGTAG CGACCTACTC AAAAATTCG GATTTCCTAA ATCTACCCA ACAACAGCTG
781 AAGAAATTTG CAGCGAGTA TACCAAGGGC CCTAATATTC ATGTTACGT CAATGAAATG
841 AATAAAGAGG TCTTGTCTCA TTACGACATT GCGACTGCGG GTGAAATCTT TGGGTACCC
901 TTGGATCAAT CGATTAAGTT CTTGATGCG CGCGTGATG AGCTGAACAT TGCATTAC
961 TTTGACTTAA TCAGACTCGA TCGAGACTCT GATCAAAGAT GCGGTGAAA AGATTGGAAA
1021 TTGTGCAAT TCGGCAGAT CATCGATAAC GTTGACCTA CTGCAGGAGA ATATGTTGG
1081 AATGCCCTCT TCTTGATAA CACGACAAT CCGCGGCTG TCTGCACTT TGGGATGAT
1141 GATCGCCAC AATGGGTGA GGCATGGCT AAAGGCTTG CAACCTGAC GCTGACTCAA
1201 CGAGCAACAC CTTTATTTA TCAAGTTCA GAATTGGGCA TGACCAATTA CCGTTTAAA
1261 GCTATTGATG AATTGATGA TATTGAGGTG AAAGTTTTT GGCATGACTA CGTTGAGACA
1321 GGAAAGSTCA AAGGAGCA GTTCTTGCAA AATGTACGOC TGACGAGCAG GGATAACAGC
1381 CGGACGCGT TOCAATGGGA TGGGAGCAA AATGCAGGAT TCACGAGGG AAAACCTTGG
1441 TTCAAGSTCA AOCCAAATA CCAGGAAATC AATGCAGTAA GTCAAGTCAC ACAACCGAC
1501 TCAGTATTTA ACTATTATCG TCAGTTGATC AAGATAAGGC ATGACATOC GGCAGTGAOC
1561 TATGGTACAT ACACGATTT GGATCTGCA AATGATTGG TCTACGCTA TACAGCAGC
1621 CTTGGGGGG AAAAATATCT TGTGTGTGTT AACTTCAAGG AGCAAATGAT GAGATATAAA

```

- 33 -

1681 TTACGGGATA ATTATOCAT TGAGAAAGTG ATTATAGACA GCAACAGCAA AAACGTGGTG  
1741 AAAAAGAATG ATTCATTAAT CGAGCTAAAA CCATGGCAGT CAGGGGTTTA TAAACTTAA  
1801 TCAATAAATC TCATAGTCAC GCCAAATAAT GTAAATATAT TGAAACTATT AAAACGGCA  
1861 TTTTATGCCG GTTTTTTATG CGCAAATAG

- 34 -

SEQ ID NO. 2

BESCHREIBUNG: E. rhapontici Isomerase

LÄNGE: 1305 Basen

\*\*\* S E Q U E N Z \*\*\*

```
1  ATGTCCTCTC AAGGATTGAA AACGGCTNTC GCTATTTTTC TTGCAACCAC TTTTCTGCC
61  ACATCCTATC AGGCCTGCAG TGCCNNNCCA GATACCGCCC CCTCACTCAC CGTTCAGCAA
121 TCAAATGCCC TGCCACATG GTGGAAGCAG GCTGTTTTTT ATCAGGTATA TCCACGCTCA
181 TTTAAAGATA CGAATGGGGA TGGCATTGGG GATTTAAACG GTATTATTGA GAATTTAGAC
241 TATCTGAAGA AACTGGGTAT TGATGCGATT TGGATCAATC CACATTACGA TTCGCCGAAT
301 ACGGATAATG GTTATGACAT CCGGGATTAC CGTAAGATAA TGAAAGAATA CGGTACGATG
361 GAAGACTTTG ACCGTCTTAT TTCAGAAATG AAGAAACGCA ATATGCGTTT GATGATTGAT
421 ATTGTTATCA ACCACACCAG CGATCAGCAT GCCTGGTTTG TTCAGAGCAA ATCGGGTAAG
481 AACAAACCCCT ACAGGGACTA TTACTTCTGG CGTGACGGTA AGGATGGCCA TGCCCCCAAT
541 AACTATCCCT CTTCTTCGG TGGCTCAGCC TGGGAAAAAG ACGATAAATC AGGCCAGTAT
601 TACCTCCATT ACTTTGCCAA ACAGCAACCC GACCTCAACT GGGACAATCC CAAAGTCCGT
661 CAAGACCTGT ATGACATGCT CCGCTTCTGG TTAGATAAAG GCGTTTCTGG TTTACGCTTT
721 GATACCGTTG CCACCTACTC GAAAATCCCG AACTTCCCTG ACCTTAGCCA ACAGCAGTTA
781 AAAAAATTCG CCGAGGAATA TACTAAAGGT CCTAAAATTC ACGACTACGT GAATGAAATG
841 AACAGAGAAG TATTATCCCA CTATGATATC GCCACTGCGG GGGAAATATT TGGGGTTCCT
901 CTGGATAAAT CGATTAAGTT TTTCGATCGC CGTAGAAATG AATTAAATAT AGCGTTTACG
961 TTTGATCTGA TCAGGCTCGA TCGTGATGCT GATGAAAGAT GCGGCGGAAA AGACTGGACC
1021 CTTTCGCAGT TCCGAAAAAT TGTCGATAAG GTTGACCAA CCGCAGGAGA GTATGGGTGG
1081 AATGCCTTTT TCTTAGACAA TCACGACAAT CCCCSCGCGG TTTCTCACTT TGGTGATGAT
1141 CGACCACAAT GCGCGGAGCA TCGGCGGAAA GCACTGGCAA CATTGACGCT GACCCAGCGT
1201 GCAACGCCGT TTATCTATCA GGGTTCAGAA CTCGGTATGA CCAATTATCC CTTTAAAAAA
1261 ATCGATGATT TCGATGATGT AGAGGTGAAA GGTTTTTGGC AAGAC
```

- 35 -

SEQ ID NO. 3

NAME: SZISO1.DNA

BESCHREIBUNG: SZ62-Isomerase

LÄNGE: 471 Basen

\* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

1 GTTTTTTATC AGATCTATCC TCGCTCATTT AAAGACACCA ATGATGATGG CATTGGCGAT  
61 ATTCGCGGTA TTATTGAAAA GCTGGACTAT CTGAAATCGC TCGGTATTGA CGCTATCTGG  
121 ATCAATCCCC ATTACGACTC TCCGAACACC GATAACGGCT ATGACATCAG TAATTATCGT  
181 CAGATAATGA AAGAGTATGG CACAATGGAG GATTTTGATA GCCTTGTTCG CGAAATGAAA  
241 AAACGAAATA TCGCCTTAAT GATCGACGTG GTCATTAACC ATACCAGTGA TCAACACCCG  
301 TGGTTTATTC AGAGTAAAAG CGATAAAAC AACCCCTATC GTGACTATTA TTTCTGGCGT  
361 GACGGAAAAG ATAATCAGCC ACCTAATAAT TACCCCTCAT TTTTCGGCGG CTCGGCATGG  
421 CAAAAGATG CAAAGTCAGG ACAGTACTAT TTACACTATT TTGCCAGACA G

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 36 -

SEQ ID NO. 4

NAME: Pr Isomerase

LÄNGE: 1890 Basen oder 629 Aminosäuren

BESCHREIBUNG: Protaminobacter rubrum: Isomerase

## \*\*\* S E Q U E N Z \*\*\*

- 1    ATG CCC CGT CAA GGA TTG AAA ACT GCA CTA GCG ATT TTT CTA ACC ACA  
Met    Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
- 49    TCA TTA TGC ATC TCA TGC CAG CAA GCC TTC GGT ACG CAA CAA CCC TTG  
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu
- 97    CTT AAC GAA AAG AGT ATC GAA CAG TCG AAA ACC ATA CCT AAA TGG TGG  
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp
- 145    AAG GAG GCT GTT TTT TAT CAG GTG TAT CCG CGC TCC TTT AAA GAC ACC  
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
- 193    AAC GGA GAT GGC ATC GGG GAT ATT AAC GGC ATC ATA GAA AAA TTA GAC  
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
- 241    TAT CTA AAA GGC TTG GGG ATT GAT GGC ATT TGG ATC AAC CCA CAT TAT  
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
- 289    GAT TCT CCG AAC ACG GAT AAT GGT TAC GAT ATA CGT GAT TAT CGA AAA  
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
- 337    ATC ATG AAA GAA TAT GGC ACG ATG GAG GAT TTT GAC CGC CTG ATT TCT  
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
- 385    GAA ATG AAA AAA CGG AAT ATG CGG TTG ATG ATT GAT GTG GTC ATC AAC  
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 37 -

- 433 CAC AOC AGC GAT CAA AAC GAA TGG TTT GTT AAA AGT AAA AGC AGT AAG  
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys
- 481 GAT AAT CCT TAT CGC GGC TAT TAT TTC TGG AAA GAT GCT AAA GAA GGG  
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
- 529 CAG GCG CCT AAT AAT TAC OCT TCA TTC TTT GGT GGC TCG GCG TGG CAA  
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
- 577 AAA GAT GAA AAG ACC AAT CAA TAC TAC CTG CAC TAT TTT GCT AAA CAA  
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
- 625 CAG CCT GAC CTA AAC TGG GAT AAT CCC AAA GTC CGT CAA GAT CTT TAT  
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
- 673 GCA ATG TTA CGT TTC TGG TTA GAT AAA GGC GTG TCT GGT TTA CGT TTT  
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
- 721 GAT ACG GTA GCG ACC TAC TCA AAA ATT CCG GAT TTC CCA AAT CTC ACC  
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
- 769 CAA CAA CAG CTG AAG AAT TTT GCA GCG GAG TAT ACC AAG GGC CCT AAT  
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
- 817 ATT CAT CGT TAC GTC AAT GAA ATG AAT AAA GAG GTC TTG TCT CAT TAC  
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr
- 865 GAC ATT GCG ACT GCG GGT GAA ATC TTT GGC GTA CCC TTG GAT CAA TCG  
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
- 913 ATA AAG TTC TTC GAT CGC CGC CGT GAT GAG CTG AAC ATT GCA TTT ACC  
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
- 961 TTT GAC TTA ATC AGA CTC GAT CGA GAC TCT GAT CAA AGA TGG CGT CGA  
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg

- 38 -

1009 AAA GAT TGG AAA TTG TCG CAA TTC CCG CAG ATC ATC GAT AAC GTT GAC  
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp

1057 CGT ACT GCA GGA GAA TAT GGT TGG AAT GGC TTC TTC TTG GAT AAC CAC  
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His

1105 GAC AAT CCG CGC GCT GTC TCG CAC TTT GGC GAT GAT GAT CGC CCA CAA  
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Asp Arg Pro Gln

1153 TGG CGT GAG CCA TCG GCT AAA GCG CTT GCA ACC TTG ACG CTG ACT CAA  
Trp Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln

1201 CGA GCA ACA CCT TTT ATT TAT CAA GGT TCA GAA TTG GGC ATG ACC AAT  
Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn

1249 TAC CCG TTT AAA GCT ATT GAT GAA TTC GAT GAT ATT GAG GTG AAA GGT  
Tyr Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly

1297 TTT TGG CAT GAC TAC GTT GAG ACA GGA AAG GTC AAA GGC GAC GAG TTC  
Phe Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe

1345 TTG CAA AAT GTA CGC CTG ACG AGC AGG GAT AAC AGC CCG ACG CCG TTC  
Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe

1393 CAA TGG GAT GCG AGC AAA AAT GCA GGA TTC ACG AGC GGA AAA OCT TGG  
Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp

1441 TTC AAG GTC AAC CCA AAC TAC CAG GAA ATC AAT GCA GTA AGT CAA GTC  
Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val

1489 ACA CAA CCC GAC TCA GTA TTT AAC TAT TAT CGT CAG TTG ATC AAG ATA  
Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile



- 39 -

1537 AGG CAT GAC ATC CCG GCA CTG ACC TAT GGT ACA TAC ACC GAT TTG GAT  
Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp

1585 OCT GCA AAT GAT TCG GTC TAC GGC TAT ACA CGC AGC CTT GCG GCG GAA  
Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu

1633 AAA TAT CTT GTT GTT GTT AAC TTC AAG GAG CAA ATG ATG AGA TAT AAA  
Lys Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys

1681 TTA CCG GAT AAT TTA TCC ATT GAG AAA GTG ATT ATA GAC AGC AAC AGC  
Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser

1729 AAA AAC GTG GTG AAA AAG AAT GAT TCA TTA CTC GAG CTA AAA CCA TGG  
Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp

1777 CAG TCA GCG GTT TAT AAA ACT AAA TCA ATA AAT CTC ATA GTC ACG CCA  
Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro

1825 AAT AAT GTA AAT ATA TTG AAA CTA TTA AAA CCG GCA TTT TAT GGC GGT  
Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly

1873 TTT TTT AGC GCA AAA TAG  
Phe Phe Ser Ala Lys \*\*\*

- 40 -

SEQ ID NO. 5

BESCHREIBUNG: E. rhapontici Isomerase

LÄNGE: 1305 Basen oder 435 Aminosäuren

\* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

1 ATG TCC TCT CAA GGA TTG AAA ACG GCT NTC GCT ATT TTT CTT GCA ACC  
Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala ? Ala Ile Phe Leu Ala Thr

49 ACT TTT TCT GCC ACA TCC TAT CAG GCC TGC AGT GCC NNN CCA GAT ACC  
Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala ? Pro Asp Thr

97 GCC CCC TCA CTC ACC GTT CAG CAA TCA AAT GCC CTG CCC ACA TGG TGG  
Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp

145 AAG CAG GCT GTT TTT TAT CAG GTA TAT CCA CGC TCA TTT AAA GAT ACG  
Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr

193 AAT GGG GAT GGC ATT GGG GAT TTA AAC GGT ATT ATT GAG AAT TTA GAC  
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp

241 TAT CTG AAG AAA CTG GGT ATT GAT GCG ATT TGG ATC AAT CCA CAT TAC  
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr

289 GAT TCG CCG AAT ACG GAT AAT GGT TAT GAC ATC CGG GAT TAC CGT AAG  
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys

337 ATA ATG AAA GAA TAC GGT ACG ATG GAA GAC TTT GAC CGT CTT ATT TCA  
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser

385 GAA ATG AAG AAA CGC AAT ATG CGT TTG ATG ATT GAT ATT GTT ATC AAC  
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn

433 CAC ACC AGC GAT CAG CAT GCC TGG TTT GTT CAG AGC AAA TCG GGT AAG  
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys

481 AAC AAC CCC TAC AGG GAC TAT TAC TTC TGG CGT GAC GGT AAG GAT GGC  
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly

529 CAT GCC CCC AAT AAC TAT CCC TCC TTC TTC GGT GGC TCA GCC TGG GAA  
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu

577 AAA GAC GAT AAA TCA GGC CAG TAT TAC CTC CAT TAC TTT GCC AAA CAG  
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln

- 41 -

625 CAA CCC GAC CTC AAC TGG GAC AAT CCC AAA GTC CGT CAA GAC CTG TAT  
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr

673 GAC ATG CTC CGC TTC TGG TTA GAT AAA GGC GTT TCT GGT TTA CGC TTT  
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe

721 GAT ACC GTT GCC ACC TAC TCG AAA ATC CCG AAC TTC CCT GAC CTT AGC  
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser

769 CAA CAG CAG TTA AAA AAT TTC GCC GAG GAA TAT ACT AAA GGT CCT AAA  
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys

817 ATT CAC GAC TAC GTG AAT GAA ATG AAC AGA GAA GTA TTA TCC CAC TAT  
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr

865 GAT ATC GCC ACT GCG GGG GAA ATA TTT GGG GTT CCT CTG GAT AAA TCG  
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser

913 ATT AAG TTT TTC GAT CGC CGT AGA AAT GAA TTA AAT ATA GCG TTT ACG  
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr

961 TTT GAT CTG ATC AGG CTC GAT CGT GAT GCT GAT GAA AGA TGG CGG CGA  
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg

---

1009 AAA GAC TGG ACC CTT TCG CAG TTC CGA AAA ATT GTC GAT AAG GTT GAC  
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp

1057 CAA ACG GCA GGA GAG TAT GGG TGG AAT GCC TTT TTC TTA GAC AAT CAC  
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His

1105 GAC AAT CCC CGC GCG GTT TCT CAC TTT GGT GAT GAT CGA CCA CAA TGG  
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp

1153 CGC GAG CAT GCG GCG AAA GCA CTG GCA ACA TTG ACG CTG ACC CAG CGT  
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg

1201 GCA ACG CCG TTT ATC TAT CAG GGT TCA GAA CTC GGT ATG ACC AAT TAT  
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr

1249 CCC TTT AAA AAA ATC GAT GAT TTC GAT GAT GTA GAG GTG AAA GGT TTT  
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe

1297 TGG CAA GAC  
Trp Gln Asp

- 42 -

SEQ ID NO. 6

NAME: SZISO1.DNA

BESCHREIBUNG: SZ62-Isomerase

LÄNGE: 471 Basen

## \* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

1 GTT TTT TAT CAG ATC TAT CCT CGC TCA TTT AAA GAC ACC AAT GAT GAT  
Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp

49 GGC ATT GGC GAT ATT CGC GGT ATT ATT GAA AAG CTG GAC TAT CTG AAA  
Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys

97 TCG CTC GGT ATT GAC GCT ATC TGG ATC AAT CCC CAT TAC GAC TCT CCG  
Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro

145 AAC ACC GAT AAC GGC TAT GAC ATC AGT AAT TAT CGT CAG ATA ATG AAA  
Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys

193 GAG TAT GGC ACA ATG GAG GAT TTT GAT AGC CTT GTT GCC GAA ATG AAA  
Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys

241 AAA CGA AAT ATG CGC TTA ATG ATC GAC GTG GTC ATT AAC CAT ACC AGT  
Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser

289 GAT CAA CAC CCG TGG TTT ATT CAG AGT AAA AGC GAT AAA AAC AAC CCT  
Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro

337 TAT CGT GAC TAT TAT TTC TGG CGT GAC GGA AAA GAT AAT CAG CCA CCT  
Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro

385 AAT AAT TAC CCC TCA TTT TTC GGC GGC TCG GCA TGG CAA AAA GAT GCA  
Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala

433 AAG TCA GGA CAG TAC TAT TTA CAC TAT TTT GCC AGA CAG  
Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln

- 43 -

SEQ ID NO. 7

NAME: PALA.SEQ

LÄNGE: 1362 Basen

BESCHREIBUNG: Palatinase

\*\*\* S E Q U E N Z \*\*\*

```

61  ATGGCTACAA AAATCGTTTT AGTGGGGGCA GGCAGGGGCG AATTGGGCTA CGGCACCCCTG
121 GGCGATATCT TCCAGAGCAA GAGCGTGTAC GGCAGTGAAA TTGTGCTGCA TGACATCAAC
181 CCAACCTGCG TGGGCGTGAC CGAGAAAACC GGGCGTGAAT TCCTGGCTGC GGAAGATCTG
241 CCGTTTATCG TCAGGGGACG CACCGATGCG AAAACGGGCG TGAGGGGAGC GCGTTCGTG
301 ATTATC CCA TTGA GTGGG CGACGGCTDT GGGCTGTGGG ATCTGGACTG GCAGATCCCG
361 CACAGATATG GCATTCAGCA GGTGTATGCT GAAAACGGTG GGGCTGGGCG GCTGTTCAC
421 TGGCTGGGCA TCATTCACCG GATCTCTGAC ATCTGGGGCG AAGTGGGGCA CATTTGCCCG
481 AAGGCGTGGG TATTCACCTA CTGGAACCGG ATGAGGGGCA TTTCGACCGC CGTGCATGCG
541 CGTTTCCCGC AGCTCAACTT TGTGGGCAAT TGCCATGAAA TGGGCTCACT TGAGGGTTAT
601 CTGCCAGAAA TGCTGGGCGC CTGCTTGGAC AATCTCACTC TGGGGGCTGC CGGGCTGAAC
661 CACTTCAGCG TGTTGCTGGA GGCAGCTAT AAAGACAGCG GAAAAGAGCG TTACGGGGAC
721 GTAGGGGCGA AGGCACGGCA CTATTTCTCC CGTCTGCGCG GCTACAGCGA TATTCGGCT
781 TACACCGGCA ATCAGGGCAA ATTGGTGGAG ACAGAAGGCA GCADGGAGCG CGATGGGCTG
841 GGGGCAAAAG ACAGGGGCTA TCCGTGGGGG GACCGCAAGC TGTTCAAAGA GATCTGGAG
901 AAGTTTCACC ATTTGGCGAT CAAGGGGCGC AGCCACTTTG GCGAGTACAT CGTTTGGGCG
961 AGCGAAGTCA GCGATCAAGG CGGTATCTCT GATTTCCTCA CCTTCACCG CAACATCTG
1021 GGGCATGTGC AGCCAAAAT CGAACTGAAG CTGAAAGAAC GGTGGGTGCC GATCATGGAA
1081 GGGATCTCTA CCGATTCGGG TTATGAAGAG TCTGGGGTCA ACATTCGAA CCAGGGATT
1141 ATCAAGCAAC TGCGGGGCTT TATTGGGCTC GAAGTCCCGG CGATTATCGA CGCAAGGGC
1201 GTCCAGGCA TCAAGGTGTA TATGCTGGG GGCATGGGTG GCTGTGTGAG CAACAGATT
1261 GCGATTCAG ATCTGACCG CGACCGAGTG ATTGAAGGCT CGCGGACCT GGTATCCAG
1321 GGGCTGCTGG TGGACTGGT CAACGATAAA TGCGGGGCGA TACGGGACT GGTGGAGG
ATGATCTCAC GCGAGGGGCG GTGGCTGGAT TACCTGAAT AA
```

- 44 -

SEQ ID NO. 8

NAME: PALA.SEO

LÄNGE: 1362 Basen oder 453 Aminosäuren

BESCHREIBUNG: Palatinase

## \*\*\* S E Q U E N Z \*\*\*

1    ATG GCT ACA AAA ATC GTT TTA GTG GGC GCA GGC AGC GCG CAA TTC GGC  
Met Ala Thr Lys Ile Val Leu Val Gly Ala Gly Ser Ala Gln Phe Gly

49    TAC GGC ACC CTG GGC GAT ATC TTC CAG AGC AAG ACG CTG TAC GGC AGT  
Tyr Gly Thr Leu Gly Asp Ile Phe Gln Ser Lys Thr Leu Tyr Gly Ser

97    GAA ATT GTG CTG CAT GAC ATC AAC CCA ACC TCG CTG GCG GTG ACC GAG  
Glu Ile Val Leu His Asp Ile Asn Pro Thr Ser Leu Ala Val Thr Glu

145    AAA ACC GCG CGT GAC TTC CTG GCT GCG GAA GAT CTG CCG TTT ATC GTC  
Lys Thr Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ala Glu Asp Leu Pro Phe Ile Val

193    AGC GCG ACC ACC GAT CGC AAA ACC GCG CTG AGC GGA GCG GAG TTC GTG  
Ser Ala Thr Thr Asp Arg Lys Thr Ala Leu Ser Gly Ala Glu Phe Val

241    ATT ATC TCC ATT GAA GTG GGC GAC CGC TTT GCG CTG TGG GAT CTC GAC  
Ile Ile Ser Ile Glu Val Gly Asp Arg Phe Ala Leu Trp Asp Leu Asp

289    TGG CAG ATC CCG CAA CAG TAT GGC ATT CAG CAG GTG TAT GGT GAA AAC  
Trp Gln Ile Pro Gln Gln Tyr Gly Ile Gln Gln Val Tyr Gly Glu Asn

337    GGT GGC CCT GGC GGG CTG TTC CAC TCG CTG CGC ATC ATT CCA CCG ATC  
Gly Gly Pro Gly Gly Leu Phe His Ser Leu Arg Ile Ile Pro Pro Ile

385    CTC GAC ATC TGC GCG GAC GTG GCG GAC ATT TGC CCG AAC GCG TGG GTA  
Leu Asp Ile Cys Ala Asp Val Ala Asp Ile Cys Pro Asn Ala Trp Val

- 45 -

- 433 TTC AAC TAC TCG AAC CCG ATG AGC CCG ATT TGC ACC ACC GTG CAT CCG  
Phe Asn Tyr Ser Asn Pro Met Ser Arg Ile Cys Thr Thr Val His Arg
- 481 CGT TTC CCG CAG CTC AAC TTT GTC GGC ATG TGC CAT GAA ATC GCC TCA  
Arg Phe Pro Gln Leu Asn Phe Val Gly Met Cys His Glu Ile Ala Ser
- 529 CTT GAG CGT TAT CTG CCA GAA ATG CTC GGC ACC TCC TTC GAC AAT CTC  
Leu Glu Arg Tyr Leu Pro Glu Met Leu Gly Thr Ser Phe Asp Asn Leu
- 577 ACT CTG CCG GCT GCC GGG CTG AAC CAC TTC AGC GTG TTG CTG GAG GCC  
Thr Leu Arg Ala Ala Gly Leu Asn His Phe Ser Val Leu Leu Glu Ala
- 625 AGC TAT AAA GAC AGC GGA AAA GAC GCT TAC GCC GAC GTA CCG GCC AAG  
Ser Tyr Lys Asp Ser Gly Lys Asp Ala Tyr Ala Asp Val Arg Ala Lys
- 673 GCA CCG GAC TAT TTC TCC CGT CTG CCG GGC TAC AGC GAT ATT CTG GCT  
Ala Pro Asp Tyr Phe Ser Arg Leu Pro Gly Tyr Ser Asp Ile Leu Ala
- 
- 721 TAC ACC CCG AAT CAC GGC AAA TTG GTG GAG ACA GAA GGC AGC ACC GAA  
Tyr Thr Arg Asn His Gly Lys Leu Val Glu Thr Glu Gly Ser Thr Glu
- 769 CCG GAT GCG CTG GGC GGC AAA GAC AGC GGC TAT CCG TGG GCG GAC CCG  
Arg Asp Ala Leu Gly Gly Lys Asp Ser Ala Tyr Pro Trp Ala Asp Arg
- 817 ACG CTG TTC AAA GAG ATC CTG GAG AAG TTT CAC CAT TTG CCG ATC ACC  
Thr Leu Phe Lys Glu Ile Leu Glu Lys Phe His His Leu Pro Ile Thr
- 865 GGC GAC AGC CAC TTT GGC GAG TAC ATC CGT TGG GCG AGC GAA GTC AGC  
Gly Asp Ser His Phe Gly Glu Tyr Ile Arg Trp Ala Ser Glu Val Ser
- 913 GAT CAC CCG GGT ATC CTC GAT TTC TAC ACC TTC TAC CCG AAC TAT CTG  
Asp His Arg Gly Ile Leu Asp Phe Tyr Thr Phe Tyr Arg Asn Tyr Leu
- 961 GGG CAT GTG CAG CCA AAA ATC GAA CTG AAG CTG AAA GAA CCG GTG GTG  
Gly His Val Gln Pro Lys Ile Glu Leu Lys Leu Lys Glu Arg Val Val

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 46 -

1009 CCG ATC ATG GAA GGG ATC CTC ACC GAT TCC GGT TAT GAA GAG TCT GCG  
Pro Ile Met Glu Gly Ile Leu Thr Asp Ser Gly Tyr Glu Glu Ser Ala

1057 GTC AAC ATT CCG AAC CAG GGA TTT ATC AAG CAA CTG CCG-GCG TTT ATT  
Val Asn Ile Pro Asn Gln Gly Phe Ile Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile

1105 GGC GTC GAA GTC CCG GCG ATT ATC GAC CGC AAG GGC GTG CAC GGC ATC  
Ala Val Glu Val Pro Ala Ile Ile Asp Arg Lys Gly Val His Gly Ile

1153 AAG GTC GAT ATG CCT GCG GGC ATC GGT GGC CTG TTG AGC AAC CAG ATT  
Lys Val Asp Met Pro Ala Gly Ile Gly Gly Leu Leu Ser Asn Gln Ile

1201 GCG ATT CAC GAT CTG ACC GCG GAC GCA GTG ATT GAA GGC TCG CGC GAC  
Ala Ile His Asp Leu Thr Ala Asp Ala Val Ile Glu Gly Ser Arg Asp

1249 CTG GTT ATC CAG GCG CTG CTG GTG GAC TCG GTC AAC GAT AAA TGC CCG  
Leu Val Ile Gln Ala Leu Leu Val Asp Ser Val Asn Asp Lys Cys Arg

1297 GCG ATA CCG GAA CTG GTG GAC GTG ATG ATC TCA CGC CAG GGC CCG TGG  
Ala Ile Pro Glu Leu Val Asp Val Met Ile Ser Arg Gln Gly Pro Trp

1345 CTC GAT TAC CTG AAA TAA  
Leu Asp Tyr Leu Lys —

ERSATZBLATT (REGEL 26)



- 47 -

SEQ ID NO. 9

BESCHREIBUNG: P. rubrum Isomerase (Variante)

LÄNGE: 1803 Basenpaare

\* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

```
1  ATGCCCCGTC AAGGATTGAA AACTGCACTA GCGATTTTTC TAACCACATC ATTATGCATC
61  TCATGCCAGC AAGCCTTCGG TACGCAACAA CCCTTGCTTA ACGAAAAGAG TATCGAACAG
121 TCGAAAACCA TACCTAAATG GTGGAAGGAG GCTGTTTTTT ATCAGGTGTA TCCGCGCTCC
181 TTTAAAGACA CCAACGGAGA TGGCATCGGG GATATTAACG GCATCATAGA AAAATTAGAC
241 TATCTAAAAG CTTGGGGAT TGATGCCATT TGGATCAACC CACATTATGA TTCTCCGAAC
301 ACGGATAATG GTTACGATAT ACGTGATTAT CGAAAAATCA TGAAAGAATA TGGCACGATG
361 GAGGATTTTG ACCGCCTGAT TTCTGAAATG AAAAAACGGA ATATGCGGTT GATGATTGAT
421 GTGGTCATCA ACCACACCAG CGATCAAAAC GAATGGTTTG TAAAAAGTAA AAGCAGTAAG
481 GATAATCCTT ATCGCGGCTA TTATTTCTGG AAAGATGCTA AAGAAGGGCA GCGCGCTAAT
541 AATTACCCTT CATTCTTTGG TGGCTCGGCG TGGCAAAAAG ATGAAAAGAC CAATCAATAC
601 TACCTGCACT ATTTTGCTAA ACAACAGCCT GACCTAAACT GGGATAATCC CAAAGTCCGT
661 CAAGATCTTT ATGCAATGTT ACGTTTCTGG TTAGATAAAG GCGTGTCTGG TTTACGTTTT
721 GATACGGTAG CGACCTACTC AAAAATTCCG GATTTCCTCA ATCTCACCCA ACAACAGCTG
781 AAGAATTTTG CAGCGGAGTA TACCAAGGGC CCTAATATTC ATCGTTACGT CAATGAAATG
841 AATAAGAGG TCTTGTCTCA TTACGACATT GCGACTGCCG GTGAAATCTT TGGCGTACCC
901 TTGGATCAAT CGATAAAGTT CTTGATCGC CGCCGTGATG AGCTGAACAT TGCATTTACC
961 TTTGACTTAA TCAGACTCGA TCGAGACTCT GATCAAAGAT GGCGTCGAAA AGATTGGAAA
1021 TTGTCGCAAT TCCGGCAGAT CATCGATAAC GTTGACCGTA CTGCAGGAGA ATATGGTTGG
1081 AATGCCTTCT TCTTGATAA CCACGACAAT CCGCGCGCTG TCTCGCACTT TGGCGATGAT
1141 CGCCCACAAT GGCGTGAGCC ATCGGCTAAA GCGCTTGCAA CCTTGACGCT GACTCAACGA
1201 GCAACACCTT TTATTTATCA AGGTTTCAAG TTGGGCATGA CCAATTACCC GTTTAAAGCT
1261 ATTGATGAAT TCGATGATAT TGAGGTGAAA GGTTTTTGGC ATGACTACGT TGAGACAGGA
1321 AAGGTCAAAG CCGACGAGTT CTTGCAAAAT GTACGCCTGA CGAGCAGGGA TAACAGCCGG
1381 ACGCCGTTCC AATGGGATGG GAGCAAAAAT GCAGGATTCA CGAGCGGAAA ACCTTGGTTC
1441 AAGGTCAACC CAACTACCA GGAAATCAAT GCAGTAAGTC AAGTCACACA ACCCGACTCA
1501 GTATTTAACT ATTATCGTCA GTTGATCAAG ATAAGGCATG ACATCCCGGC ACTGACCTAT
1561 GGTACATACA CCGATTTGGA TCCTGCAAAT GATTGCGTCT ACGCCTATAC ACGCAGCCTT
1621 GGGGCGGAAA AATATCTTGT TGTGTTAAC TTCAAGGAGC AAATGATGAG ATATAAATTA
1681 CCGGATAATT TATCCATTGA GAAAGTGATT ATAGACAGCA ACAGCAAAAA CGTGGTGAAA
1741 AAGAATGATT CATTACTCGA GCTAAAACCA TGGCAGTCAG GGGTTTATAA ACTAAATCAA
1801 TAA
```

- 48 -

SEQ ID NO. 10

BESCHREIBUNG: P. rubrum Isomerase (Variante)

LÄNGE: 1803 Basen oder 600 Aminosäuren

\* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

1 ATG CCC CGT CAA GGA TTG AAA ACT GCA CTA GCG ATT TTT CTA ACC ACA  
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr

49 TCA TTA TGC ATC TCA TGC CAG CAA GCC TTC GGT ACG CAA CAA CCC TTG  
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu

97 CTT AAC GAA AAG AGT ATC GAA CAG TCG AAA ACC ATA CCT AAA TGG TGG  
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp

145 AAG GAG GCT GTT TTT TAT CAG GTG TAT CCG CGC TCC TTT AAA GAC ACC  
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr

193 AAC GGA GAT GGC ATC GGG GAT ATT AAC GGC ATC ATA GAA AAA TTA GAC  
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp

241 TAT CTA AAA GCC TTG GGG ATT GAT GCC ATT TGG ATC AAC CCA CAT TAT  
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr

289 GAT TCT CCG AAC ACG GAT AAT GGT TAC GAT ATA CGT GAT TAT CGA AAA  
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys

337 ATC ATG AAA GAA TAT GGC ACG ATG GAG GAT TTT GAC CGC CTG ATT TCT  
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser

385 GAA ATG AAA AAA CGG AAT ATG CGG TTG ATG ATT GAT GTG GTC ATC AAC  
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn

433 CAC ACC AGC GAT CAA AAC GAA TGG TTT GTT AAA AGT AAA AGC AGT AAG  
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys

481 GAT AAT CCT TAT CGC GGC TAT TAT TTC TGG AAA GAT GCT AAA GAA GGG  
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly

529 CAG GCG CCT AAT AAT TAC CCT TCA TTC TTT GGT GGC TCG GCG TGG CAA  
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln

577 AAA GAT GAA AAG ACC AAT CAA TAC TAC CTG CAC TAT TTT GCT AAA CAA  
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln

- 49 -

625 CAG CCT GAC CTA AAC TGG GAT AAT CCC AAA GTC CGT CAA GAT CTT TAT  
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr

673 GCA ATG TTA CGT TTC TGG TTA GAT AAA GGC GTG TCT GGT TTA CGT TTT  
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe

721 GAT ACG GTA GCG ACC TAC TCA AAA ATT CCG GAT TTC CCA AAT CTC ACC  
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr

769 CAA CAA CAG CTG AAG AAT TTT GCA GCG GAG TAT ACC AAG GGC CCT AAT  
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn

817 ATT CAT CGT TAC GTC AAT GAA ATG AAT AAA GAG GTC TTG TCT CAT TAC  
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr

865 GAC ATT GCG ACT GCC GGT GAA ATC TTT GGC GTA CCC TTG GAT CAA TCG  
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser

913 ATA AAG TTC TTC GAT CGC CGC CGT GAT GAG CTG AAC ATT GCA TTT ACC  
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr

961 TTT GAC TTA ATC AGA CTC GAT CGA GAC TCT GAT CAA AGA TGG CGT CGA  
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg

---

1009 AAA GAT TGG AAA TTG TCG CAA TTC CGG CAG ATC ATC GAT AAC GTT GAC  
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp

1057 CGT ACT GCA GGA GAA TAT GGT TGG AAT GCC TTC TTC TTG GAT AAC CAC  
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His

1105 GAC AAT CCG CGC GCT GTC TCG CAC TTT GGC GAT GAT CGC CCA CAA TGG  
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp

1153 CGT GAG CCA TCG GCT AAA GCG CTT GCA ACC TTG ACG CTG ACT CAA CGA  
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg

1201 GCA ACA CCT TTT ATT TAT CAA GGT TCA GAA TTG GGC ATG ACC AAT TAC  
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr

1249 CCG TTT AAA GCT ATT GAT GAA TTC GAT GAT ATT GAG GTG AAA GGT TTT  
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe

1297 TGG CAT GAC TAC GTT GAG ACA GGA AAG GTC AAA GCC GAC GAG TTC TTG  
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu

1345 CAA AAT GTA CGC CTG ACG AGC AGG GAT AAC AGC CGG ACG CCG TTC CAA  
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln

- 50 -

1393 TGG GAT GGG AGC AAA AAT GCA GGA TTC ACG AGC GGA AAA CCT TGG TTC  
Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe

1441 AAG GTC AAC CCA AAC TAC CAG GAA ATC AAT GCA GTA AGT CAA GTC ACA  
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr

1489 CAA CCC GAC TCA GTA TTT AAC TAT TAT CGT CAG TTG ATC AAG ATA AGG  
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg

1537 CAT GAC ATC CCG GCA CTG ACC TAT GGT ACA TAC ACC GAT TTG GAT CCT  
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro

1585 GCA AAT GAT TCG GTC TAC GCC TAT ACA CGC AGC CTT GGG GCG GAA AAA  
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys

1633 TAT CTT GTT GTT GTT AAC TTC AAG GAG CAA ATG ATG AGA TAT AAA TTA  
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu

1681 CCG GAT AAT TTA TCC ATT GAG AAA GTG ATT ATA GAC AGC AAC AGC AAA  
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys

1729 AAC GTG GTG AAA AAG AAT GAT TCA TTA CTC GAG CTA AAA CCA TGG CAG  
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln

1777 TCA GGG GTT TAT AAA CTA AAT CAA TAA  
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln ---

- 51 -

SEQ ID NO. 11

BESCHREIBUNG: SZ 62-Isomerase

LÄNGE: 1794 Basen

## \* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

```
1  ATGTCTTTTG TTACGCTACG TACCGGGGTG GCTGTCGCGC TGTEATCTTT GATAATAAGT
61  CTGGCCTGCC CGGCTGTCAG TGCTGCACCA TCCTTGAATC AGGATATTCA CGTTCAAAAG
121 GAAAGTGAAT ATCCTGCATG GTGGAAAGAA GCTGTTTTTT ATCAGATCTA TCCTCGCTCA
181 TTTAAAGACA CCAATGATGA TGGCATTGGC GATATTCGCG GTATTATTGA AAAGCTGGAC
241 TATCTGAAAT CGCTCGGTAT TGACGCTATC TGGATCAATC CCCATTACGA CTCTCCGAAC
301 ACCGATAACG GCTATGACAT CAGTAATTAT CGTCAGATAA TGAAAGAGTA TGGCACAATG
361 GAGGATTTTG ATAGCCTTGT TGCCGAAATG AAAAAACGAA ATATGCGCTT AATGATCGAC
421 GTGGTCATTA ACCATAACCAG TGATCAACAC CCGTGGTTTA TTCAGAGTAA AAGCGATAAA
481 AACAACCCTT ATCGTGAATA TTATTCTGG CGTGACGGAA AAGATAATCA GCCACCTAAT
541 AATTACCCCT CATTTTTCGG CGGCTCGGCA TGGCAAAAAG ATGCAAAGTC AGGACAGTAC
601 TATTTACACT ATTTTGCCAG ACAGCAACCT GATCTCAACT GGGATAACCC GAAAGTACGT
661 GAGGATCTTT ACGCAATGCT CCGCTTCTGG CTGGATAAAG GCGTTTCAGG CATGCGATTT
721 GATACGGTGG CAACTTATTC CAAATCCCG GGATTTCCTA ATCTGACACC TGAACAACAG
781 AAAAATTTTG CTGAACAATA CACCATGGGD CCTAATATTC ATCGATACAT TCAGGAAATG
841 AACCAGAAAG TTCTGTCCCG GTATGATGTG GCCACCGCGG GTGAAATTTT TGGCGTCCCG
901 CTGGATCGTT CGTCGCAGTT TTTTGATCGC CGCCGACATG AGCTGAATAT GCGGTTTATG
961 TTTGACCTCA TTCGTCTCGA TCGCGACAGC AATGAACGCT GCGGTCACAA GTCGTGGTCG
1021 CTCTCTCAGT TCCGCCAGAT CATCAGCAAA ATGGATGTCA CGGTCCGAAA GTATGGCTGG
1081 AACACGTTCT TCTTAGACAA CCATGACAAC CCCCCTGCGG TATCTCACTT CGGGGATGAC
1141 AGGCCGCAAT GCGGGGAGGC GTCGGCTAAG GCACTGGCGA CGATTACCCT CACTCAGCGG
1201 GCGACGCCGT TTATTTATCA GGGTTCAGAG CTGGGAATGA CTAATTATCC CTTCAGGCAA
1261 CTCAACGAAT TTGACGACAT CGAGGTCAAA GGTTCCTGGC AGGATTATGT CCAGAGTGGA
1321 AAAGTCACGG CCACAGAGTT TCTCGATAAT GTGCGCCTGA CGAGCCGCGA TAACAGCAGA
1381 ACACCTTTCC AGTGGAATGA CACCCTGAAT GCTGGTTTTA CTCGCGGAAA GCCGTGGTTT
1441 CACATCAACC CAACTATGT GGAGATCAAC SCCGAACGCG AAGAAACCCG CGAAGATTCA
1501 GTGCTGAATT ACTATAAAAA AATGATTCAG CTACGCCACC ATATCCCTGC TCTGGTATAT
1561 GCGCCTATC AGGATCTTAA TCCACAGGAC AATACCGTTT ATGCCTATAC CCGAACGCTG
1621 GGTAACGAGC GTTATCTGGT CGTGGTGAAC TTTAAGGAGT ACCCGGTCCG CTATACTCTC
1681 CCGGCTAATG ATGCCATCGA GGAAGTGGTC ATTGATACTC AGCAGCAAGG TGCGCCGCAC
1741 AGCACATCCC TGTCATTGAG CCCCTGGCAG GCAGGTGCGT ATAAGCTGCG GTAA
```

- 52 -

SEQ ID NO. 12

BESCHREIBUNG: SZ 62-Isomerase

LÄNGE: 1794 Basen oder 597 Aminosäuren

## \* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

1 ATG TCT TTT GTT ACG CTA CGT ACC GGG GTG GCT GTC GCG CTG TCA TCT  
Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser

49 TTG ATA ATA AGT CTG GCC TGC CCG GCT GTC AGT GCT GCA CCA TCC TTG  
Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu

97 AAT CAG GAT ATT CAC GTT CAA AAG GAA AGT GAA TAT CCT GCA TGG TGG  
Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp

145 AAA GAA GCT GTT TTT TAT CAG ATC TAT CCT CGC TCA TTT AAA GAC ACC  
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr

193 AAT GAT GAT GGC ATT GGC GAT ATT CGC GGT ATT ATT GAA AAG CTG GAC  
Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp

241 TAT CTG AAA TCG CTC GGT ATT GAC GCT ATC TGG ATC AAT CCC CAT TAC  
Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr

289 GAC TCT CCG AAC ACC GAT AAC GGC TAT GAC ATC AGT AAT TAT CGT CAG  
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln

337 ATA ATG AAA GAG TAT GGC ACA ATG GAG GAT TTT GAT AGC CTT GTT GCC  
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala

385 GAA ATG AAA AAA CGA AAT ATG CGC TTA ATG ATC GAC GTG GTC ATT AAC  
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn

433 CAT ACC AGT GAT CAA CAC CCG TGG TTT ATT CAG AGT AAA AGC GAT AAA  
His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys

481 AAC AAC CCT TAT CGT GAC TAT TAT TTC TGG CGT GAC GGA AAA GAT AAT  
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn

529 CAG CCA CCT AAT AAT TAC CCC TCA TTT TTC GGC GGC TCG GCA TGG CAA  
Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln

577 AAA GAT GCA AAG TCA GGA CAG TAC TAT TTA CAC TAT TTT GCC AGA CAG  
Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln

625 CAA CCT GAT CTC AAC TGG GAT AAC CCG AAA GTA CGT GAG GAT CTT TAC  
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr

- 53 -

673 GCA ATG CTC CGC TTC TGG CTG GAT AAA GGC GTT TCA GGC ATG CGA TTT  
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe

721 GAT ACG GTG GCA ACT TAT TCC AAA ATC CCG GGA TTT CCC AAT CTG ACA  
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr

769 CCT GAA CAA CAG AAA AAT TTT GCT GAA CAA TAC ACC -ATG GGD CCT AAT  
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met ? Pro Asn

817 ATT CAT CGA TAC ATT CAG GAA ATG AAC CGG AAA GTT CTG TCC CGG TAT  
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr

865 GAT GTG GCC ACC GCG GGT GAA ATT TTT GGC GTC CCG CTG GAT CGT TCG  
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser

913 TCG CAG TTT TTT GAT CGC CGC CGA CAT GAG CTG AAT ATG GCG TTT ATG  
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met

961 TTT GAC CTC ATT CGT CTC GAT CGC GAC AGC AAT GAA CGC TGG CGT CAC  
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His

1009 AAG TCG TGG TCG CTC TCT CAG TTC CGC CAG ATC ATC AGC AAA ATG GAT  
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp

---

1057 GTC ACG GTC GGA AAG TAT GGC TGG AAC ACG TTC TTC TTA GAC AAC CAT  
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His

1105 GAC AAC CCC CGT GCG GTA TCT CAC TTC GGG GAT GAC AGG CCG CAA TGG  
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp

1153 CGG GAG GCG TCG GCT AAG GCA CTG GCG ACG ATT ACC CTC ACT CAG CGG  
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg

1201 GCG ACG CCG TTT ATT TAT CAG GGT TCA GAG CTG GGA ATG ACT AAT TAT  
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr

1249 CCC TTC AGG CAA CTC AAC GAA TTT GAC GAC ATC GAG GTC AAA GGT TTC  
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe

1297 TGG CAG GAT TAT GTC CAG AGT GGA AAA GTC ACG GCC ACA GAG TTT CTC  
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu

1345 GAT AAT GTG CGC CTG ACG AGC CGC GAT AAC AGC AGA ACA CCT TTC CAG  
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln

1393 TGG AAT GAC ACC CTG AAT GCT GGT TTT ACT CGC GGA AAG CCG TGG TTT  
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe

- 54 -

1441 CAC ATC AAC CCA AAC TAT GTG GAG ATC AAC SCC GAA CGC GAA GAA ACC  
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn ? Glu Arg Glu Glu Thr

1489 CGC GAA GAT TCA GTG CTG AAT TAC TAT AAA AAA ATG ATT CAG CTA CGC  
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg

1537 CAC CAT ATC CCT GCT CTG GTA TAT GGC GCC TAT CAG GAT CTT AAT CCA  
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro

1585 CAG GAC AAT ACC GTT TAT GCC TAT ACC CGA ACG CTG GGT AAC GAG CGT  
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg

1633 TAT CTG GTC GTG GTG AAC TTT AAG GAG TAC CCG GTC CGC TAT ACT CTC  
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu

1681 CCG GCT AAT GAT GCC ATC GAG GAA GTG GTC ATT GAT ACT CAG CAG CAA  
Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln

1729 GGT GCG CCG CAC AGC ACA TCC CTG TCA TTG AGC CCC TGG CAG GCA GGT  
Gly Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly

1777 GCG TAT AAG CTG CGG TAA  
Ala Tyr Lys Leu Arg ---



- 55 -

SEQ ID NO. 13

BESCHREIBUNG: MX 45-Isomerase

LÄNGE: 1782 Basen

\* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

```
1  ATGCTTATGA AGAGATTATT CGCCGCGTCT CTGATGCTTG CTTTTTCAAG CGTCTCCTCT
61  GTGAGGGCTG AGGAGGCCGT AAAGCCGGGC GCGCCATGGT GGAAAAGTGC TGTCTTCTAT
121 CAGGTCTATC CGCGCTCGTT CAAGGATACC AACGGTGATG GGATCGGCGA TTTCAAAGGA
181 CTGACGGAGA AGCTCGACTA TCTCAAGGGG CTCGGCATAG ACGCCATCTG GATCAATCCA
241 CATTACGCGT CTCCCAACAC CGATAATGGC TACGATATCA GCGACTATCG AGAGGTCATG
301 AAGGAATATG GGACGATGGA GGACTTCGAT CGTCTGATGG CTGAGTTGAA GAAGCGCGGC
361 ATGCGGCTCA TGGTTGATGT CGTGATCAAC CATTGAGTG ACCAACACGA ATGGTTCAAG
421 AGCAGCCGGG CCTCCAAAGA CAATCCCTAC CGTGAATATT ATTCTGGCG TGACGGCAAA
481 GACGGTCACG AGCCAAACAA TTACCTTCC TTCTTCGGCG GTTCGGCATG GGAGAAGGAC
541 CCCGTAACCG GGCAATATTA CCTGCATTAT TTCGGTCGTC AGCAGCCAGA TCTGAACTGG
601 GACACGCCGA AGCTTCGCGA GGAATCTAT GCGATGCTGC GGTTCGGCT CGACAAGGGC
661 GTATCAGGCA TCGGTTTCA TACGGTGGCT ACCTACTCGA AGACACCGGG TTTCCCGGAT
721 CTGACACCGG AGCAGATGAA GAACTTCGCG GAGGCCTATA CCCAGGGGCC GAACCTTCAT
781 CGTTACCTGC AGGAAATGCA CGAGAAGGTC TTCGATCATT ATGACGCGGT CACGGCCGGC
841 GAAATCTTCG GCGCTCCGCT CAATCAAGTG CCGCTGTTCA TCGACAGCCG GAGGAAAGAG
901 CTGGATATGG CTTTCACCTT CGATCTGATC CGTTATGATC GCGCACTGGA TC GTTGGCAT
961 ACCATTCCGC GTACCTTAGC GGACTTCCGT CAAACGATCG ATAAGGTCGA CGCCATCGCG
1021 GGC GAATATG GCTGGAACAC GTTCTTCCTC GGCAATCACG ACAATCCCCG TCGGATATCG
1081 CTTTTGGTG ACGATCGGCC GCAATGGCGC GAAGCCTCGG CCAAGGCTCT GGCCACCGTC
1141 ACCTTGACCC AGCGAGGAAC GCCGTTTCATC TTCCAAGGAG ATGAACTCGG AATGACCAAC
1201 TACCCCTTCA AGACGCTGCA GGACTTTGAT GATATCNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
1261 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
1321 NNNNNNNNNN NTGTGGCGTT GACTAGCCGA GCAAACGCCC GCACGCCCTT TCAATGGGAT
1381 GACAGTGCTA ATGCGGGATT CAAACTGGC AAGCCTTGGC TAAAGGTCAA TCCAACTAC
1441 ACTGAGATCA ACGCCGCGCG GGAAATTGGC GATCCTAAAT CGGTCTACAG CTTTTACCGC
1501 AACCTGATCT CAATCCGGCA TGAAACTCCC GCTCTTTCGA CCGGGAGCTA TCGCGACATC
1561 GATCCGAGTA ATGCCGATGT CTATGCCTAT ACGCGCAGCC AGGATGGCGA GACCTATCTG
1621 GTCGTAGTCA ACTTCAAGGC AGAGCCAAGG AGTTTCACGC TTCCGGACGG CATGCATATT
1681 GCCGAAACCC TGATTGAGAG CAGTTCGCCA GCAGCTCCGG CGGCGGGGGC TGCAAGCCTT
1741 GAGCTGCAGC CTTGGCAGTC CGGCATCTAC AAGGTGAAGT AA
```

- 56 -

SEQ ID NO. 14

BESCHREIBUNG: MX 45-Isomerase

LÄNGE: 1782 Basen oder 593 Aminosäuren

## \* \* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

1 ATG CTT ATG AAG AGA TTA TTC GCC GCG TCT CTG ATG CTT GCT TTT TCA  
Met Leu Met Lys Arg Leu Phe Ala Ala Ser Leu Met Leu Ala Phe Ser

49 AGC GTC TCC TCT GTG AGG GCT GAG GAG GCC GTA AAG CCG GGC GCG CCA  
Ser Val Ser Ser Val Arg Ala Glu Glu Ala Val Lys Pro Gly Ala Pro

97 TGG TGG AAA AGT GCT GTC TTC TAT CAG GTC TAT CCG CGC TCG TTC AAG  
Trp Trp Lys Ser Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys

145 GAT ACC AAC GGT GAT GGG ATC GGC GAT TTC AAA GGA CTG ACG GAG AAG  
Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Phe Lys Gly Leu Thr Glu Lys

193 CTC GAC TAT CTC AAG GGG CTC GGC ATA GAC GCC ATC TGG ATC AAT CCA  
Leu Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro

241 CAT TAC GCG TCT CCC AAC ACC GAT AAT GGC TAC GAT ATC AGC GAC TAT  
His Tyr Ala Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr

289 CGA GAG GTC ATG AAG GAA TAT GGG ACG ATG GAG GAC TTC GAT CGT CTG  
Arg Glu Val Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu

337 ATG GCT GAG TTG AAG AAG CGC GGC ATG CGG CTC ATG GTT GAT GTC GTG  
Met Ala Glu Leu Lys Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Val Asp Val Val

385 ATC AAC CAT TCG AGT GAC CAA CAC GAA TGG TTC AAG AGC AGC CGG GCC  
Ile Asn His Ser Ser Asp Gln His Glu Trp Phe Lys Ser Ser Arg Ala

433 TCC AAA GAC AAT CCC TAC CGT GAC TAT TAT TTC TGG CGT GAC GGC AAA  
Ser Lys Asp Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys

481 GAC GGT CAC GAG CCA AAC AAT TAC CCT TCC TTC TTC GGC GGT TCG GCA  
Asp Gly His Glu Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala

529 TGG GAG AAG GAC CCC GTA ACC GGG CAA TAT TAC CTG CAT TAT TTC GGT  
Trp Glu Lys Asp Pro Val Thr Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Gly

577 CGT CAG CAG CCA GAT CTG AAC TGG GAC ACG CCG AAG CTT CGC GAG GAA  
Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Thr Pro Lys Leu Arg Glu Glu

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 57 -

625 CTC TAT GCG ATG CTG CGG TTC TGG CTC GAC AAG GGC GTA TCA GGC ATG  
Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met

673 CGG TTC GAT ACG GTG GCT ACC TAC TCG AAG ACA CCG GGT TTC CCG GAT  
Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Thr Pro Gly Phe Pro Asp

721 CTG ACA CCG GAG CAG ATG AAG AAC TTC GCG GAG GCC TAT ACC CAG GGG  
Leu Thr Pro Glu Gln Met Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Gln Gly

769 CCG AAC CTT CAT CGT TAC CTG CAG GAA ATG CAC GAG AAG GTC TTC GAT  
Pro Asn Leu His Arg Tyr Leu Gln Glu Met His Glu Lys Val Phe Asp

817 CAT TAT GAC GCG GTC ACG GCC GGC GAA ATC TTC GGC GCT CCG CTC AAT  
His Tyr Asp Ala Val Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Ala Pro Leu Asn

865 CAA GTG CCG CTG TTC ATC GAC AGC CGG AGG AAA GAG CTG GAT ATG GCT  
Gln Val Pro Leu Phe Ile Asp Ser Arg Arg Lys Glu Leu Asp Met Ala

913 TTC ACC TTC GAT CTG ATC CGT TAT GAT CGC GCA CTG GAT CGT TGG CAT  
Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Tyr Asp Arg Ala Leu Asp Arg Trp His

961 ACC ATT CCG CGT ACC TTA GCG GAC TTC CGT CAA ACG ATC GAT AAG GTC  
Thr Ile Pro Arg Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Thr Ile Asp Lys Val

1009 GAC GCC ATC GCG GGC GAA TAT GGC TGG AAC ACG TTC TTC CTC GGC AAT  
Asp Ala Ile Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Gly Asn

1057 CAC GAC AAT CCC CGT GCG GTA TCG CAT TTT GGT GAC GAT CGG CCG CAA  
His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln

1105 TGG CGC GAA GCC TCG GCC AAG GCT CTG GCC ACC GTC ACC TTG ACC CAG  
Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu Thr Gln

1153 CGA GGA ACG CCG TTC ATC TTC CAA GGA GAT GAA CTC GGA ATG ACC AAC  
Arg Gly Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn

1201 TAC CCC TTC AAG ACG CTG CAG GAC TTT GAT GAT ATC NNN NNN NNN NNN  
Tyr Pro Phe Lys Thr Leu Gln Asp Phe Asp Asp Ile ? ? ? ?

1249 NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN  
? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ?

1297 NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNT GTG GCG TTG ACT  
? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? Val Ala Leu Thr

1345 AGC CGA GCA AAC GCC CGC ACG CCC TTT CAA TGG GAT GAC AGT GCT AAT  
Ser Arg Ala Asn Ala Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Asp Ser Ala Asn

- 58 -

1393 GCG GGA TTC ACA ACT GGC AAG CCT TGG CTA AAG GTC AAT CCA AAC TAC  
Ala Gly Phe Thr Thr Gly Lys Pro Trp Leu Lys Val Asn Pro Asn Tyr

1441 ACT GAG ATC AAC GCC GCG CGG GAA ATT GGC GAT CCT AAA TCG GTC TAC  
Thr Glu Ile Asn Ala Ala Arg Glu Ile Gly Asp Pro Lys Ser Val Tyr

1489 AGC TTT TAC CGC AAC CTG ATC TCA ATC CGG CAT GAA ACT CCC GCT CTT  
Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Ser Ile Arg His Glu Thr Pro Ala Leu

1537 TCG ACC GGG AGC TAT CGC GAC ATC GAT CCG AGT AAT GCC GAT GTC TAT  
Ser Thr Gly Ser Tyr Arg Asp Ile Asp Pro Ser Asn Ala Asp Val Tyr

1585 GCC TAT ACG CGC AGC CAG GAT GGC GAG ACC TAT CTG GTC GTA GTC AAC  
Ala Tyr Thr Arg Ser Gln Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Val Val Val Asn

1633 TTC AAG GCA GAG CCA AGG AGT TTC ACG CTT CCG GAC GGC ATG CAT ATT  
Phe Lys Ala Glu Pro Arg Ser Phe Thr Leu Pro Asp Gly Met His Ile

1681 GCC GAA ACC CTG ATT GAG AGC AGT TCG CCA GCA GCT CCG GCG GCG GGG  
Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly

1729 GCT GCA AGC CTT GAG CTG CAG CCT TGG CAG TCC GGC ATC TAC AAG GTG  
Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Val

1777 AAG TAA  
Lys ---

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 59 -

SEQ ID NO. 15

BESCHREIBUNG: MX 45-Palatinose-Hydrolase

LÄNGE: 1704 Basen

\* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

```
1  ATGACTGAAA AGTTATCCTT CGAGTCGACA ACAATCTCGC GTCGCTGGTG GAAAGAGGCT
61  GTTGTCTATC AGGTGTATCC CCCCTCGTTC CAGGATTCTGA ACGGGGACGG CATCGGCGAC
121 CTTCGGGGCA TAACTGCGAG GCTAGATTAC ATCCTCGGTC TAGGCGTTAG TGTCATCTGG
181 CTCAGCCCCC ATTTGACTC TCCGAATGCT GACAACGGCT ACGATATCCG TGAATATCGC
241 AAGGTGATGC GCGAATTCGG CACCATGGCG GATTTCTGATC ACCTGCTGGC CGAGACGAAA
301 AAGCGCGGCA TCGGCTGAT CATCGATCTC GTCGTCAACC ATACCAGCGA CGAGCATGTC
361 TGGTTTGCCG AAAGCCGGGC CTCGAAAAAC AGCCCGTACC GTGATTACTA CATCTGGCAT
421 CCCGGCCGGG ACGGCGCCGA GCCGAACGAC TGGCGCTCAT TTTTCTCGGG CTCGGCATGG
481 ACTTTGACCC AGCCAACCGG CGAATACTAC ATGCATCTTT TCGCCGATAA ACAGCCGGAT
541 ATCAACTGGG ACAATCCGGC TGTGCGCGCC GATGTCTATG ACATCATGCG CTTTGGCTG
601 GACAAGGGCG TCGACGGATT CCGCATGGAT GTCATCCCCT TCATCTCCAA GCAAGACGGC
661 CTGCCCCACT ATCCTGACCA TCATCGCGGC GCGCCGAGT TTTTCCACGG TTCGGGTCCC
721 CGCTTGACAG ACTATCTTCA GGAAATGAAC CGCGAGGTAT TGTCGCATTA CGATGTGATG
781 ACGGTTGGCG AGGCCTTCGG TGTGACGGCG GATGCGACGC CGCTTCTGGT CGACGAACGG
841 CGCCGCGAAC TGAACATGAT CTTCAATTTT GACGCCGTGC GCATCGGCCC TGGCGAGACC
901 TGGCACACTA AGCCTTGGGC CCTGCCGGA CTTAAGGCGA TCTATGCCCC TCTGGACGCT
961 GCGACCGACC AGCACTGCTG GGGTACGGTC TTTCTCTCCA ACCACGACAA TCCTCGTCTC
1021 GTCTCCCGGT TCGGTGATGA TCATCTGAC TGGCGGGTGG CGTCGGCCAA GGTTCCTGCC
1081 ACACCTCTCC TAACGCTGAA GGGCACGCCT TTCATCTACC AAGGCGATGA ATTGGGCATG
1141 ACCAACTATC CTCGGCTCGG TCGAGGAGAC GACGATATCG AGGTGCGCAA CGCCTGGCAG
1201 GCTGAGGTCA TGACCGGTAA GCGGATGCA GCCGAATTTT TCGGGGAGAT GCTGAAGATT
1261 TCCCGCGATC ATTCCCGCAC ACCGATGCAA TGGGACGCCA GTCTCGACGG TGGTTTCACT
1321 CGGGGTGAAA AGCCCTGGCT ATCGGTCAAT CCGAACTATC GGGCGATCAA TCGCGATGCG
1381 GCACTCGCCG ATCCCGATTG GATCTACCAT TATTACGCCG CACTCATCCG TTTCCGGCGC
1441 GAGACACCGG CGCTCATCTA CGGCGATTAT GACGACTTGG CGCCGGATCA TCCGCACCTC
1501 TTCGTCTATA CAAGAACATT GGGGTCCGAG CGCTATCTGG TCGCGCTTAA CTTCTCCGGC
1561 GATGCGCAGG CACTTGTTCT CCCGACAGAC CTGAGCGCCG CGTCACCTGT TATCGGGCGC
1621 GCCCCGCAAG TGGACCGCAT GCAGCATGAT GCTGCACGGA TCGAGCTGAT GGGTTGGGAA
1681 GCGCGGTCT ACCACTGCGC ATGA
```

- 60 -

SEQ ID NO. 16

BESCHREIBUNG: MX 45-Palatinose-Hydrolase

LÄNGE: 1704 Basen oder 567 Aminosäuren

\* \* \* S E Q U E N Z \* \* \*

1 ATG ACT GAA AAG TTA TCC TTC GAG TCG ACA ACA ATC TCG CGT CGC TGG  
Met Thr Glu Lys Leu Ser Phe Glu Ser Thr Thr Ile Ser Arg Arg Trp

49 TGG AAA GAG GCT GTT GTC TAT CAG GTG TAT CCC CGC TCG TTC CAG GAT  
Trp Lys Glu Ala Val Val Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Gln Asp

97 TCG AAC GGG GAC GGC ATC GGC GAC CTT CCG GGC ATA ACT GCG AGG CTA  
Ser Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Pro Gly Ile Thr Ala Arg Leu

145 GAT TAC ATC CTC GGT CTA GGC GTT AGT GTC ATC TGG CTC AGC CCC CAT  
Asp Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Val Ser Val Ile Trp Leu Ser Pro His

193 TTC GAC TCT CCG AAT GCT GAC AAC GGC TAC GAT ATC CGT GAC TAT CGC  
Phe Asp Ser Pro Asn Ala Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg

241 AAG GTG ATG CGC GAA TTC GGC ACC ATG GCG GAT TTC GAT CAC CTG CTG  
Lys Val Met Arg Glu Phe Gly Thr Met Ala Asp Phe Asp His Leu Leu

289 GCC GAG ACG AAA AAG CGC GGC ATG CGG CTG ATC ATC GAT CTC GTC GTC  
Ala Glu Thr Lys Lys Arg Gly Met Arg Leu Ile Ile Asp Leu Val Val

337 AAC CAT ACC AGC GAC GAG CAT GTC TGG TTT GCC GAA AGC CGG GCC TCG  
Asn His Thr Ser Asp Glu His Val Trp Phe Ala Glu Ser Arg Ala Ser

385 AAA AAC AGC CCG TAC CGT GAT TAC TAC ATC TGG CAT CCC GGC CGG GAC  
Lys Asn Ser Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Ile Trp His Pro Gly Arg Asp

433 GGC GCC GAG CCG AAC GAC TGG CGC TCA TTT TTC TCG GGC TCG GCA TGG  
Gly Ala Glu Pro Asn Asp Trp Arg Ser Phe Phe Ser Gly Ser Ala Trp

481 ACT TTC GAC CAG CCA ACC GGC GAA TAC TAC ATG CAT CTT TTC GCC GAT  
Thr Phe Asp Gln Pro Thr Gly Glu Tyr Tyr Met His Leu Phe Ala Asp

529 AAA CAG CCG GAT ATC AAC TGG GAC AAT CCG GCT GTG CGC GCC GAT GTC  
Lys Gln Pro Asp Ile Asn Trp Asp Asn Pro Ala Val Arg Ala Asp Val

577 TAT GAC ATC ATG CGC TTT TGG CTG GAC AAG GGC GTC GAC GGA TTC CGC  
Tyr Asp Ile Met Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Asp Gly Phe Arg

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 61 -

625 ATG GAT GTC ATC CCC TTC ATC TCC AAG CAA GAC GGC CTG CCC GAC TAT  
Met Asp Val Ile Pro Phe Ile Ser Lys Gln Asp Gly Leu Pro Asp Tyr

673 CCT GAC CAT CAT CGC GGC GCG CCG CAG TTT TTC CAC GGT TCG GGT CCC  
Pro Asp His His Arg Gly Ala Pro Gln Phe Phe His Gly Ser Gly Pro

721 CGC TTG CAC GAC TAT CTT CAG GAA ATG AAC CGC GAG GTA TTG TCG CAT  
Arg Leu His Asp Tyr Leu Gln Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His

769 TAC GAT GTG ATG ACG GTT GGC GAG GCC TTC GGT GTG ACG GCG GAT GCG  
Tyr Asp Val Met Thr Val Gly Glu Ala Phe Gly Val Thr Ala Asp Ala

817 ACG CCG CTT CTG GTC GAC GAA CGG CGC CGC GAA CTG AAC ATG ATC TTC  
Thr Pro Leu Leu Val Asp Glu Arg Arg Arg Glu Leu Asn Met Ile Phe

865 AAT TTC GAC GCC GTG CGC ATC GGC CGT GGC GAG ACC TGG CAC ACT AAG  
Asn Phe Asp Ala Val Arg Ile Gly Arg Gly Glu Thr Trp His Thr Lys

913 CCT TGG GCC CTG CCG GAA CTT AAG GCG ATC TAT GCC CGT CTG GAC GCT  
Pro Trp Ala Leu Pro Glu Leu Lys Ala Ile Tyr Ala Arg Leu Asp Ala

961 GCG ACC GAC CAG CAC TGC TGG GGT ACG GTC TTT CTC TCC AAC CAC GAC  
Ala Thr Asp Gln His Cys Trp Gly Thr Val Phe Leu Ser Asn His Asp

---

1009 AAT CCT CGT CTC GTC TCC CGG TTC GGT GAT GAT CAT CCT GAC TGG CGG  
Asn Pro Arg Leu Val Ser Arg Phe Gly Asp Asp His Pro Asp Trp Arg

1057 GTG GCG TCG GCC AAG GTT CTT GCC ACA CTT CTC CTA ACG CTG AAG GGC  
Val Ala Ser Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Leu Leu Thr Leu Lys Gly

1105 ACG CCT TTC ATC TAC CAA GGC GAT GAA TTG GGC ATG ACC AAC TAT CCT  
Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro

1153 CGG CTC GGT CGA GGA GAC GAC GAT ATC GAG GTG CGC AAC GCC TGG CAG  
Arg Leu Gly Arg Gly Asp Asp Asp Ile Glu Val Arg Asn Ala Trp Gln

1201 GCT GAG GTC ATG ACC GGT AAG GCG GAT GCA GCC GAA TTT CTC GGG GAG  
Ala Glu Val Met Thr Gly Lys Ala Asp Ala Ala Glu Phe Leu Gly Glu

1249 ATG CTG AAG ATT TCC CGC GAT CAT TCC CGC ACA CCG ATG CAA TGG GAC  
Met Leu Lys Ile Ser Arg Asp His Ser Arg Thr Pro Met Gln Trp Asp

1297 GCC AGT CTC GAC GGT GGT TTC ACT CGG GGT GAA AAG CCC TGG CTA TCG  
Ala Ser Leu Asp Gly Gly Phe Thr Arg Gly Glu Lys Pro Trp Leu Ser

1345 GTC AAT CCG AAC TAT CGG GCG ATC AAT GCG GAT GCG GCA CTC GCC GAT  
Val Asn Pro Asn Tyr Arg Ala Ile Asn Ala Asp Ala Ala Leu Ala Asp

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 62 -

1393 CCC GAT TCG ATC TAC CAT TAT TAC GCC GCA CTC ATC CGT TTC CGG CGC  
Pro Asp Ser Ile Tyr His Tyr Tyr Ala Ala Leu Ile Arg Phe Arg Arg

1441 GAG ACA CCG GCG CTC ATC TAC GGC GAT TAT GAC GAC TTG GCG CCG GAT  
Glu Thr Pro Ala Leu Ile Tyr Gly Asp Tyr Asp Asp Leu Ala Pro Asp

1489 CAT CCG CAC CTC TTC GTC TAT ACA AGA ACA TTG GGG TCC GAG CGC TAT  
His Pro His Leu Phe Val Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ser Glu Arg Tyr

1537 CTG GTC GCG CTT AAC TTC TCC GGC GAT GCG CAG GCA CTT GTT CTC CCG  
Leu Val Ala Leu Asn Phe Ser Gly Asp Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro

1585 ACA GAC CTG AGC GCC GCG TCA CCT GTT ATC GGG CGC GCC CCG CAA GTG  
Thr Asp Leu Ser Ala Ala Ser Pro Val Ile Gly Arg Ala Pro Gln Val

1633 GAC CGC ATG CAG CAT GAT GCT GCA CGG ATC GAG CTG ATG GGT TGG GAA  
Asp Arg Met Gln His Asp Ala Ala Arg Ile Glu Leu Met Gly Trp Glu

1681 GCG CGG GTC TAC CAC TGC GCA TGA  
Ala Arg Val Tyr His Cys Ala ---

ERSATZBLATT (REGEL 26)



## PATENTANSPRÜCHE

1. DNA-Sequenz,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codiert und
  - (a) eine der in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 oder SEQ ID NO. 13 gezeigten Nukleotidsequenzen gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-codierenden Bereich,
  - (b) eine der Sequenzen aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz, oder
  - (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie
  - (a) eine der in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 oder SEQ ID NO. 13 gezeigten Nukleotidsequenzen gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-codierenden Bereich oder
  - (b) eine zu den Sequenzen aus (a) mindestens 70 % homologe Nukleotidsequenz umfaßt.
3. DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine mindestens 80 % homologe Nukleotidsequenz zu den Teilbereichen von
  - (a) Nukleotid 139 - 155 oder/und
  - (b) Nukleotid 625 - 644der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz aufweist.
4. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,

- 64 -

daß sie eine mindestens 80 % homologe Nukleotidsequenz zu den Teilbereichen von

(c) Nukleotid 995 - 1013 oder/und

(d) Nukleotid 1078 - 1094

der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz aufweist.

5. Vektor,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er mindestens eine Kopie einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
6. Vektor,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er ein prokaryontischer Vektor ist.
7. Vektor nach Anspruch 5 oder 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er ein zirkuläres Plasmid ist.
8. Vektor nach Anspruch 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er in einer Wirtszelle mit einer Kopienzahl von weniger als 10 vorliegt.
9. Vektor nach Anspruch 7 oder 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er das Saccharose-Isomerasegen unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors enthält.
10. Plasmid pHWS 88 (DSM 8824)
11. Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie mit einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder einem Vektor nach einem der Ansprüche 5 bis 10 transformiert ist.

- 65 -

12. Zelle nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine prokaryontische Zelle ist.
13. Zelle nach Anspruch 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine gram-negative prokaryontische Zelle ist.
14. Zelle nach Anspruch 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine Enterobakterienzelle ist.
15. Zelle nach Anspruch 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie eine Escherichia coli-, Protaminobacter rubrum-  
oder Erwinia rhapontici-Zelle ist.
- 16 Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es von einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1  
bis 4 codiert ist.
17. Protein nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es
- (a) eine der in SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 oder SEQ ID  
NO. 6, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 12 oder SEQ ID NO.  
14 gezeigten Aminosäuresequenzen gegebenenfalls ohne  
den Signalpeptidbereich oder
  - (b) eine zu den Sequenzen aus (a) mindestens 80 % homo-  
loge Aminosäuresequenz umfaßt.
18. Protein nach Anspruch 16 oder 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es eine mindestens 90 % homologe Aminosäuresequenz zu  
den Teilbereichen von
- (a) Aminosäure 51 - 149,

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 66 -

- (b) Aminosäure 168 - 181,
  - (c) Aminosäure 199 - 250,
  - (d) Aminosäure 351 - 387 oder/und
  - (e) Aminosäure 390 - 420
- der in SEQ ID NO. 4 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist.
19. Zelle, die mindestens eine für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codierende DNA-Sequenz enthält und einen reduzierten Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsel aufweist.
20. Zelle nach Anspruch 19,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Reduzierung des Palatinose- oder/und Trehalulosestoffwechsels durch teilweise oder vollständige Hemmung der Expression von Invertase- oder/und Palatinasegenen erfolgt.
21. *Protaminobacter rubrum* Mutante SZZ 13 (DSM 9121)
22. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren, die für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codieren,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine Genbank aus einem Spenderorganismus, der eine für ein Protein mit einer Saccharose-Isomerase-Aktivität codierende DNA-Sequenz enthält, in einem geeigneten Wirtsorganismus anlegt, die Klone der Genbank untersucht,  
und die Klone isoliert, die eine für ein Protein mit Saccharose-Isomerase-Aktivität codierende Nukleinsäure enthalten.
23. Verfahren nach Anspruch 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man als Wirtsorganismus *E.coli* verwendet.

- 67 -

24. Verfahren nach Anspruch 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß bei der Untersuchung der Klone der Genbank Saccharose-spaltende Klone und die darin enthaltenen, vom Spenderorganismus stammenden DNA-Sequenzen isoliert und in einem Galactose nicht verwertenden E.coli-Stamm transformiert werden, der als Screeningstamm für die Klone der Genbank eingesetzt wird.
25. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Untersuchung der Klone der Genbank unter Verwendung von Nukleinsäuresonden erfolgt, die aus den Sequenzen SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 11 oder SEQ ID NO. 13 abgeleitet sind.
26. Verfahren nach Anspruch 25,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man als Nukleinsäuresonde ein DNA-Fragment verwendet, das durch PCR-Amplifikation der DNA aus dem Spenderorganismus unter Verwendung der Oligonukleotidgemische 5'-TGGTGGAA(A,G)GA(A,G)GCTGT-3' und 5'-TCCCAGTTCAG(A,G)TCCGGCTG-3' als Primer erhalten wurde.
27. Verfahren zur Herstellung von nicht-kariogenen Zuckern, insbesondere Trehalulose oder/und Palatinose,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man zur Produktion der Zucker ein Protein nach einem der Ansprüche 16 bis 18, einen Organismus nach einem der Ansprüche 11 bis 15 oder 19 bis 21 oder einen Extrakt aus einem derartigen Organismus verwendet.
28. Verfahren nach Anspruch 23,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man den Organismus, den Extrakt oder das Protein in immobilisierter Form verwendet.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 68 -

29. Verwendung von Proteinen nach einem der Ansprüche 16 bis 18 oder Organismen nach einem der Ansprüche 11 bis 15 oder 19 bis 21 zur Herstellung von nicht-kariogenen Zuckern, insbesondere Trehalulose oder/und Palatinose.
30. DNA-Sequenz,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie für ein Protein mit Palatinase- oder/und Trehalulase-Aktivität codiert und
- (a) eine der in SEQ ID NO. 7 oder SEQ ID NO. 15 gezeigten Nukleotidsequenzen,
  - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder
  - (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
31. Vektor,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er mindestens eine Kopie einer DNA-Sequenz nach Anspruch 30 enthält.
32. Zelle,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie mit einer DNA-Sequenz nach Anspruch 30 oder einem Vektor nach Anspruch 31 transformiert ist.
33. Protein mit Palatinase- oder/und Trehalulase-Aktivität,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 30 codiert ist.
34. Protein nach Anspruch 33,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es eine der in SEQ ID NO. 8 oder SEQ ID NO. 16 gezeigten Aminosäuresequenzen aufweist.

ERSATZBLATT (REGEL 26)